

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bakalářská práce

**Porovnání relativního zastoupení NADP-dependentních enzymů
v rostlinách**

(Abundance of NADP-dependent enzymes in plants)

Školitel: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.

Praha 2010

Terézia Kovaľová

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Doubnerové, PhD. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne

Podpis:

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za rady, ochotu a trpělivost a veškerou pomoc poskytnu při průběhu vypracovávání této práce.

Abstrakt

NADPH má v metabolismu rostlin nenahraditelnou úlohu. Je významným substrátem pro mnoho metabolických pochodů, podílí se na udržování redoxní rovnováhy v rostlinných buňkách a je součástí antioxidačního obranného systému buněk. V této práci byla sledována aktivita vybraných NADP-dependentních enzymů poskytujících NADPH, NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME, EC 1.1.1.40), NADP-isocitrátdehydrogenasy (dekarboxylační) (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PDH, EC 1.1.1.49) a šikimátdehydrogenasy (SDH, EC 1.1.1.25) v různých rostlinách a jejich částech (listech, plodech, semenech). Cílem práce bylo z těchto rostlin vybrat vhodné modelové rostliny pro sledování vlivu abiotického stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů a také vybrat vhodné zdroje pro purifikaci těchto enzymů. Z 19 testovaných rostlin byly pro pokusy sledování vlivu stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů vybrány okurka salátová (*Cucumis sativa* L.), hrách setý (*Pisum sativum* L.), nebo leknín (*Nymphaea*) jako vodomilné rostliny a kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris*) jako rostlina suchomilná.

Pro purifikaci NADP-ME byly z 39 zdrojů zvoleny kořeny ředkve černé (*Raphanus sativa* var. *Major*), které byly současně bohatým zdrojem všech sledovaných enzymů. Pro purifikaci NADP-ICDH byla vybrána semena z máku setého (*Papaver somniferum*), případně merlíku chilského (*Chenopodium quinoa*), pro purifikaci G6PDH byla zvolena semena merlíku chilského a pro izolaci SDH byla vybrána semena hrachu setého (*Pisum sativum* L.)

Abstract

NADPH is an important molecule in plant metabolism. It is an indispensable substrate for many processes; participates in redox balance of the cell and it is a part of antioxidant defense system in plants. In this work, activities of selected NADP-dependent enzymes producing NADPH, NADP-malic enzyme (oxalacetate decarboxylating) (NADP-ME, EC 1.1.1.40), NADP-isocitrate dehydrogenase (decarboxylating) (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), glukosa-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) and shikimate dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.25) in various plants and their parts (leaves, fruits, seeds) were established and compared. The aim of this work was to select suitable model plants for testing the effect of abiotic stress on NADP-dependent enzymes and also to select the best source for purification of these enzymes. Cucumber (*Cucumis sativa* L.), pea (*Pisum sativum* L.), or water-lily (*Nymphaea*) were chosen as suitable water-receptive model plants and *Capsella bursa-pastoris* as xerophilic plant from 19 analyzed plants.

From group of 39 plants the most suitable for purification of NADP-ME were roots of Chinese radish (*Raphanus sativus* var. *Major*), which were simultaneously a rich source of other analyzed NADP-enzymes. The best source of NADP-ICDH was poppy (*Papaver somniferum*), or quinoa *Chenopodium quinoa*. For isolation of G6PDH and SDH were chosen quinoa (*Chenopodium quinoa*) and pea (*Pisum sativum* L.), respectively. (In Czech)

Klíčová slova

NADP-malátdehydrogenasa (dekarboxylační)

NADP-isocitrátdehydrogenasa

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Šikimátdehydrogenasa

Klíčová slova Aj

NADP-malic enzyme (decarboxylating)

NADP-isocitrate dehydrogenase

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Shikimate dehydrogenase

Seznam použitých zkratek

ASC	askorbát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
C ₃ rostliny	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je tříuhlíkatá látka (3-fosfoglycerát)
C ₄ rostlin	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je čtyřuhlíkatá látka (oxalacetát)
CAM	metabolismus rostlin z čeledi tlusticovitých (z angl. Crassulacean acid metabolism)
DHD	3-dehydrochinátdehydratasa (EC 4.2.1.10)
DHD/SDH	komplex 3-dehydrochinátdehydratasa/šikimátdehydrogenasa
DTT	dithiothreitol
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové
g	tíhové zrychlení ($g = 9,80665 \text{ m.s}^{-2}$)
G6PDH	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1. 49)
GOGAT	glutamátsynthasa (EC 1.4.1.7 nebo EC 1.4.1.14)
GS	glutaminsynthetasa (EC 6.3.1.2)
GS/GOGAT cyklus	glutamátsynthasa/glutaminsynthetasový cyklus
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NADP-ICDH	NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační) (EC 1.1.1.42,)
NADP-ME	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40,)
MET	mitochondriální elektronový transport
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PET	elektronový transport při fotosyntéze
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
PVA	<i>A virus bramboru</i>
PVP	polyvinylpolypyrrolidon

PVY	<i>Y virus bramboru</i>
Rboh	oxidasý účastníci se oxidativního vzplanutí (z angl. respiratory burst oxidases)
SDH	šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25)
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan

Obsah

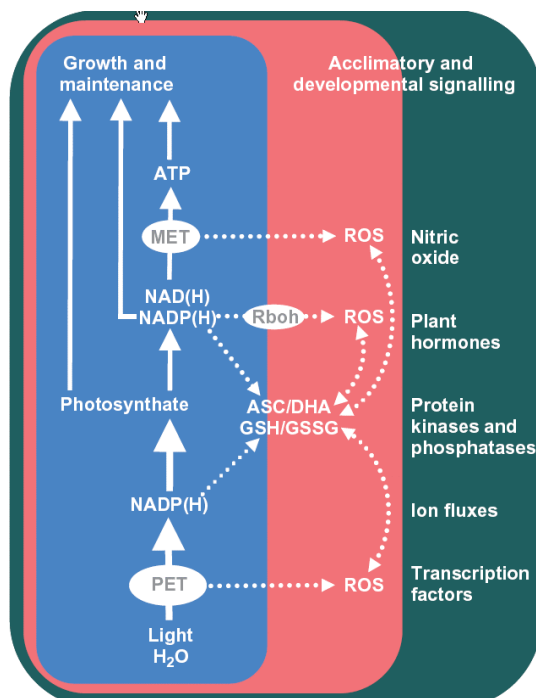
1 ÚVOD	1
1.1 Redoxní reakce	1
1.2 NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetat-dekarboxylační)	5
1.2.1 Funkce a výskyt	5
1.2.2 Souvislost ze stresem	6
1.3 NADP-isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační)	7
1.3.1 Funkce a výskyt	7
1.3.2 Souvislost ze stresem	9
1.4 Glukosa-6-fosfatdehydrogenasa	10
1.4.1 Funkce a výskyt	10
1.4.2 Souvislost ze stresem	11
1.5 Šikimátdehydrogenasa	12
1.5.1 Funkce a výskyt	12
1.5.2 Souvislost ze stresem	15
2 CÍL PRÁCE	16
3 METODY	17
3.1 Rostlinný materiál	17
3.2 Použité chemikálie	18
3.3 Použité přístroje	18
3.4 Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity	19
3.5 Stanovení enzymové aktivity	19
3.5.1 Stanovení enzymové aktivity NADP-ME	19
3.5.2 Stanovení enzymové aktivity NADP-ICDH	19
3.5.3 Stanovení enzymové aktivity G6PDH	20
3.5.4 Stanovení enzymové aktivity SDH	20
3.6 Stanovení obsahu bílkovin ve vzorku	20
4 VÝSLEDKY	21
4.1 Porovnání aktivity NADP-ME v jednotlivých skupinách rostlin	21
4.1.1 Aktivita NADP-ME v semenech	21
4.1.2 Aktivita NADP-ME v plodech, kořenech, cibulích a hlízách	22
4.1.3 Aktivita NADP-ME v listech, stonečích a výhoncích	22
4.2 Porovnání aktivity NADP-ICDH v jednotlivých skupinách rostlin	23
4.2.1 Aktivita NADP-ICDH v semenech	23
4.2.2 Aktivita NADP-ICDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách	24

4.2.3 Aktivita NADP-ICDH v listech, stoncích a výhoncích.....	25
4.3 Porovnání aktivity G6PDH v jednotlivých skupinách rostlin	25
4.3.1 Aktivita G6PDH v semenech.....	25
4.3.2 Aktivita G6PDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách.....	26
4.3.3 Aktivita G6PDH v listech, stoncích a výhoncích.....	27
4.4 Porovnání aktivity SDH v jednotlivých skupinách rostlin.....	28
4.4.1 Aktivita SDH v semenech	28
4.4.2 Aktivita SDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách	29
4.4.3 Aktivita SDH v listech, stoncích a výhoncích	30
4.5 Obsah bílkovin v rostlinných extraktech.....	30
5 DISKUSE	33
6 ZÁVĚR.....	36
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

1 ÚVOD

1.1 Redoxní reakce

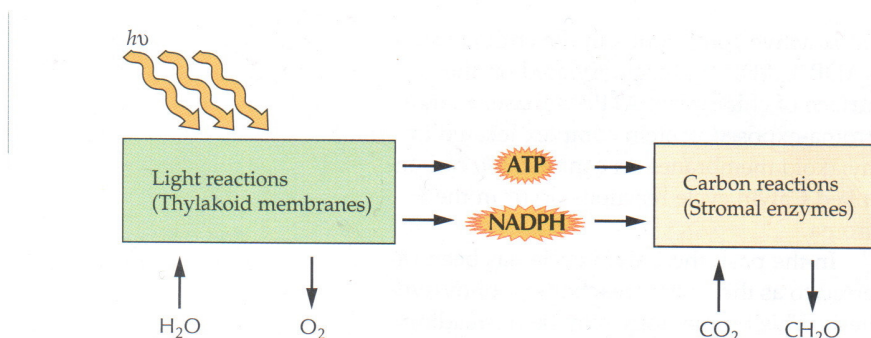
Redoxní reakce jsou fundamentální metabolické procesy, kterými buňky přeměňují a distribuují energii nezbytnou pro jejich růst, proliferaci a detoxifikaci [1]. U rostlin jsou fotoautotrofie, neschopnost regulace vnitřní teploty a neschopnost pohybu příčinou toho, že podněty vnějšího prostředí mohou potenciálně působit rozsáhlé změny jejich metabolismu. Rostliny si proto vyvinuly receptory závislé na redoxních změnách, které jim slouží jako senzory změn okolního prostředí a zároveň mechanismus, který jim umožňuje spustit redoxní změny ovlivňující expresi genů a funkce buňky. Klíčovými redoxními komponentami v rozpustné fázi buněk jsou NAD^+ , NADP, glutathion, a askorbát. Všechny tyto látky silně interagují s kyslíkovými radikály [1]. Redukovaný nukleotid NADPH je jeden z hlavních konečných produktů některých metabolických drah, je nenahraditelný substrát pro biosyntetické a detoxifikační procesy v rostlinách i živočiších a důležitou molekulou pro udržování redoxní rovnováhy v buňkách [2]. Schéma redoxních reakcí je znázorněná na obr.č. 1.



Obr.č. 1: Zjednodušené schéma výskytu redoxních reakcí v rostlinách a jejich vztah k signalizaci. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou generovány v mnohých reakcích, zejména

při fotosyntéze (elektronový transport při fotosyntéze-PET), v dýchacím řetězci (mitochondriální elektronový transport MET) a homology savčích oxidas účastnících se oxidativního vzplanutí (Rboh, z angl. respiratory burst oxidases). Jsou také produkovány dismutasami (superoxiddismutasou, katalasou) a redukčními systémy spojenými s NAD(P)H, askorbátem a glutathionem. Interakce mezi ROS, glutathionem (GSH) a askorbátem (ASC) jsou důležité pro aklimatizační signální mechanismy, pomocí kterých rostliny vnímají a odpovídají na environmentální změny. Tyto signální mechanismy jsou vzájemně ovlivňovány dalšími signálními mechanismy buňky (NO, rostlinnými hormony, proteinkinasami a fosfatasami, tokem iontů a transkripčními faktory (znázorněné zeleným rámcem) [1].

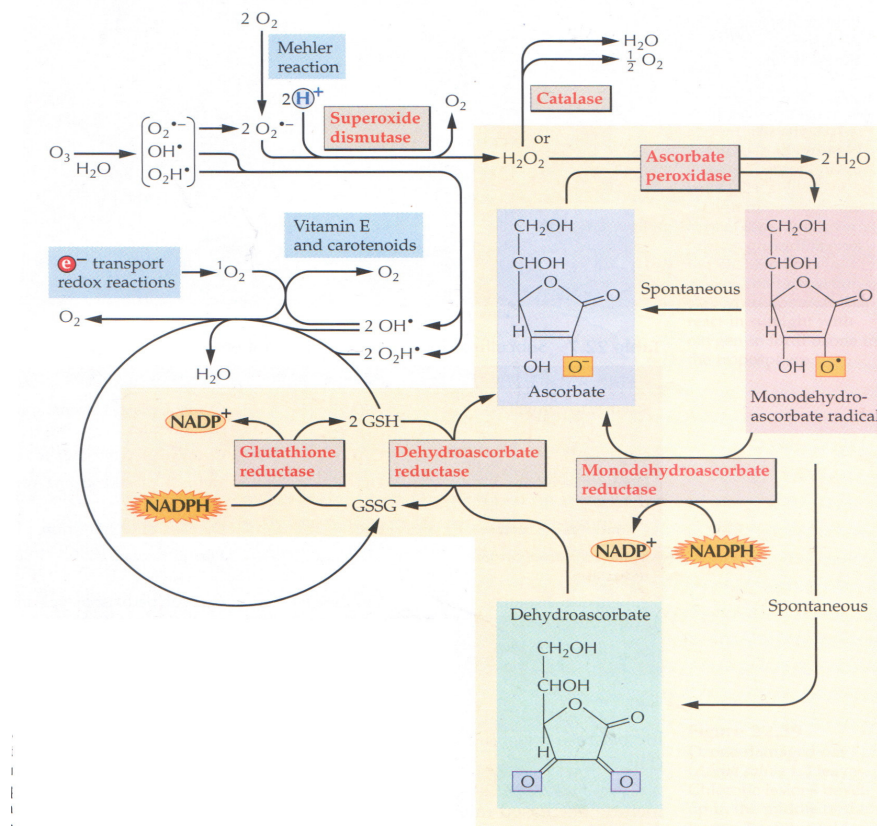
Ve fotosyntetizujících organismech NADPH vzniká jednak v thylakoidních membránách chloroplastů pomocí pochodů, v nichž je elektromagnetická energie fotonů přeměněna v energii chemickou. Takto vytvořené NADPH je poté využito Calvinovým cyklem pro syntézu hexos (obr.č. 2).



Obr.č. 2: Schéma znázorňující procesy, při kterých při fotosyntéze v thylakoidech chloroplastů dochází ke vzniku NADPH při přeměně elektromagnetická energie fotonů v energii chemickou [3]. Ta je potom využita enzymy Calvinova cyklu ve stroma chloroplastů za vzniku hexos.

Jednak je zdrojem NADPH v buňce pentosový cyklus lokalizovaný v cytosolu, konkrétně klíčové enzymy tohoto cyklu glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1. 49; dále jen G-6-PDH) a 6-fosfoglukonátdehydrogenasa (EC 1.1.1.44). Mezi hlavní enzymy, které

mají schopnost produkovat redukční ekvivalenty v podobě NADPH dále patří enzymy sledované v této práci NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40, NADP-ME), NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační) (EC 1.1.1.42, NADP-ICHD) a šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25, SDH). Takto vytvořené NADPH je využito především pro biosyntetické procesy (biosyntézu mastných kyselin, hexos, specifických obranných látek, sekundárních metabolitů), ale také při obranných reakcích rostlin, kde je dostupnost NADPH klíčová pro rovnováhu mezi produkcí a spotřebováváním reaktivních forem kyslíku (ROS) [1]. ROS jsou látky, které jsou vedlejším produktem aerobního metabolismu, především jsou však produkovány pravděpodobně membránově vázanou NADPH-oxidasou během raného stádia obranných odpovědí rostlin vůči stresu. Mezi tyto látky patří superoxidový radikál a peroxid vodíku, který má klíčovou úlohu při patogenezi, neboť se podílí na tzv. hypersenzitivní reakci, smrti hostitelských buněk v místě vstupu patogena, čímž je patogen eliminován. Dále také přispívá k posílení buněčných stěn zabraňujícímu vniknutí patogenních mikroorganismů. ROS jsou však současně pro rostlinu vysoce cytotoxické a je nezbytné je rychle detoxifikovat. K tomu slouží antioxidační látky, což jsou látky buď hydrofóbní povahy přítomné v rostlinných membránách (tokoferoly, karotenoidy, xyntofyly, flavonoidy, vitamin D) nebo ve vodě rozpustné redukční látky (glutathion, askorbát, cystein, kyselina močová a další), a antioxidační enzymy. Antioxidační látky a enzymy jsou vázány v cyklu znázorněném na obr.č. 3 str. 4. Tento cyklus je rovněž závislý na poskytování NADPH enzymy sledovanými v této práci.



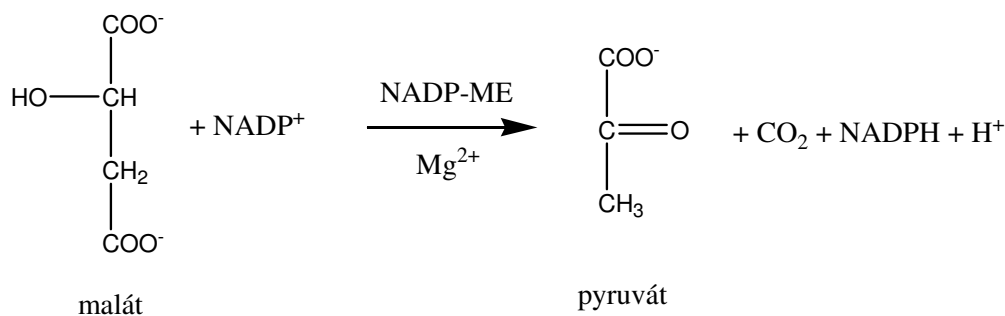
Obr.č. 3: Schematické znázornění antioxidačního systému v buňkách rostlin, skládající ho se z antioxidačních látek (askorbát, glutathion, vitamin E, karotenoidy a další) a antioxidačních enzymů. Askorbát-glutathionový cyklus je zvýrazněn žlutě. Superoxidové radikály $O_2^{\cdot-}$ jsou odstraňovány pomocí superoxiddismutasy za vzniku peroxidu vodíku. Ten je buď přeměněn katalasou na vodu a O_2 , anebo pouze na vodu při oxidaci askorbátu askorbátperoxidasou. Askorbát může být regenerovaný dvěma způsoby, a to buď pomocí monodehydroaskorbátreduktasy vyžadující NADPH, anebo dehydroaskorbát, na který se monodehydroaskorbát spontánně mění, může reagovat s glutathionem (GSH) za vzniku askorbátu a oxidovaného glutathionu (GSSG). Tato reakce je katalyzována dehydroaskorbátreduktasou. GSSG je redukován glutathionreduktasou, která opět vyžaduje NADPH. Singletový kyslík a hydroxylové radikály jsou eliminovány v glutathionovém cyklu, ale také i pomocí neenzymatických antioxidantů, vitaminu E a karotenoidů [3].

1.2 NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetat-dekarboxylační)

1.2.1 Funkce a výskyt

Systematický název L-malát:NADP⁺ oxidoreduktasa

V přítomnosti NADP⁺ jako koenzymu katalyzuje oxidační dekarboxylaci L-malátu na pyruvát, CO₂ a NADPH. Pro průběh této reakce je také nezbytná přítomnost kofaktorů, mezi nejefektivnější patří ionty Mg²⁺ a Mn²⁺ [4].



NADP-ME je součástí několika metabolických drah, v C₄ a CAM rostlinách má důležitou roli při fotosyntéze. C₄ rostliny fixují atmosférický CO₂ do C₄ kyselin v mesofylových buňkách; C₄ kyselina je potom dekarboxylována NADP-ME v sousední buňce věnčité, kde může být uvolněný CO₂ přímo využit v Calvinově cyklu. V CAM rostlinách probíhá fixace CO₂ v noci, kdy je okolní teplota nižší a rostlina tak otevřením průduchů neztrácí tolik vody transpirací. Dekarboxylace NADP-ME pak probíhá během dne a vzniklé CO₂ je využito Calvinovým cyklem [4]. Pyruvát, další produkt NADP-ME může sloužit pro získání ATP prostřednictvím dýchacího řetězce v mitochondriích [5]. NADP-ME může být také dodavatelem NADPH pro syntézu mastných kyselin, flavonoidů a ligninu [5]. Účastní se také biosyntézy terpenoidů, steroidů a derivátů alkaloidů [6].

V přírodě byla NADP-ME nalezena u zvířat a rostlin, stejně jako v prokaryotických mikroorganismech. V rostlinných tkáních je výskyt NADP-ME také široký. Tento enzym byl nalezen v květech, plodech, semenech a speciálních zásobních orgánech [16]. V rostlinných buňkách byla přítomnost tohoto enzymu zjištěna v cytoplazmě a plastidech [6].

V rostlinách bylo na základě lokalizace a funkce klasifikováno 7 isoform NADP-ME:

- 1.) $C_{4(1)}$ – NADP-ME je fotosyntetická isoforma NADP-ME, nacházející se v chloroplastech buněk pochev cévních svazků některých C_4 rostlin.
- 2.) $C_{4(2)}$ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME, nacházející se v plastidech C_4 rostlin.
- 3.) $C_{4(3)}$ – NADP-ME je cytosolová isoforma NADP-ME, nacházející se v C_4 rostlinách.
- 4.) $CAM_{(1)}$ – NADP-ME je fotosyntetická isoforma NADP-ME, vyskytující se v cytosolu CAM rostlin.
- 5.) $CAM_{(2)}$ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME, vyskytující se v cytosolu CAM rostlin.
- 6.) $C_{3(1)}$ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME, přítomná v cytosolu C_3 rostlin.
- 7.) $C_{3(2)}$ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME, přítomná v plastidech C_3 rostlin [7].

Izolace a charakterizace NADP-ME byla provedena například z listů rostliny *Aptenia cordifolia*, konstitutivní CAM rostlině. Byly nalezeny dvě isoformy se stejnou relativní molekulovou hmotností 72 000 a odlišnými I_p (6,1 pro kořenovou a 6,4 pro isoformu přítomnou v listech). Enzym vykazoval optimální aktivitu při pH 7,3. Hodnota K_m NADP-ME pro L-malát byla 1,1 mM a pro $NADP^+$ 13 μ M. Enzym byl silně kompetitivně inhibován oxaloacetátem, L-aspartátem a fosfoenolpyruvátem [8].

1.2.2 Souvislost ze stresem

V souvislosti ze stresem byla aktivita NADP-ME studována například v rostlinách fazole vystavených stresu indukovanému kadmii. Jedenáctidenní sazenice fazole byly vystaveny koncentraci kadmia běžně se vyskytující v životním prostředí. V těchto rostlinách byla zaznamenána zvýšená aktivita NADP-ME a dalších enzymů redukujících $NADP^+$ a také i enzymů askorbát-glutathionového cyklu [9].

Zvýšená aktivita NADP-ME byla také zaznamenána při výzkumu vlivu virové infekce způsobené dvěma různými viry bramboru, Y virem bramboru (PVY) a A virem bramboru (PVA) na metabolismus rostlin tabáku. Zvyšování aktivity NADP-ME

korelovalo s vývojem virové infekce, zejména u rostlin infikovaných PVY. Mírnější virus PVA způsobil v porovnání s PVY menší změny aktivity NADP-ME [10].

Vliv biotického stresu způsobeného *Y virem bramboru* na NADP-ME v rostlinách tabáku byl studován také na úrovni transkripce, translace a aktivity. Zvýšení aktivity cytosolové izoformy NADP-ME v infikovaných listech korelovalo ze zvýšeným množstvím proteinu a mRNA NADP-ME. Transkripce chloroplastové izoformy tohoto enzymu infekcí ovlivněná nebyla [11].

Nárůst aktivity NADP-ME byl také pozorován v hyperhydrických výhoncích hvozdíku karafiátu (*Dianthus caryophyllus*) [12].

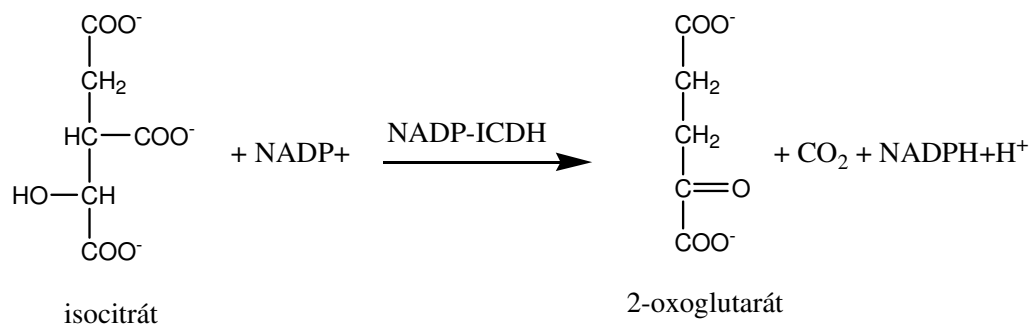
Za účelem studia přizpůsobování se rostlin suchu byla sledována genová exprese v listech rostlin ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) vystavených suchu, a sice ve vnímavé a tolerantní odrůdě. Mezi geny, jejichž exprese se vlivem sucha zvýšila v tolerantních rostlinách byl i gen pro NADP-ME. Předpokládá se, že NADP-ME se podílí na přizpůsobování se rostlin suchu prostřednictvím kontroly uzavírání průduchů prostřednictvím L-malátu [13].

Aktivita NADP-ME a dalších enzymů účastnících se metabolismu L-malátu byla také zvýšená v listech ozimného žita setého (*Secale cereale* L.) vystavenému chladu. Pokles aktivity těchto enzymů byl zaznamenán po přesunutí listů z jejich optimální růstové teploty 4°C do prostředí s teplotou 22°C [14].

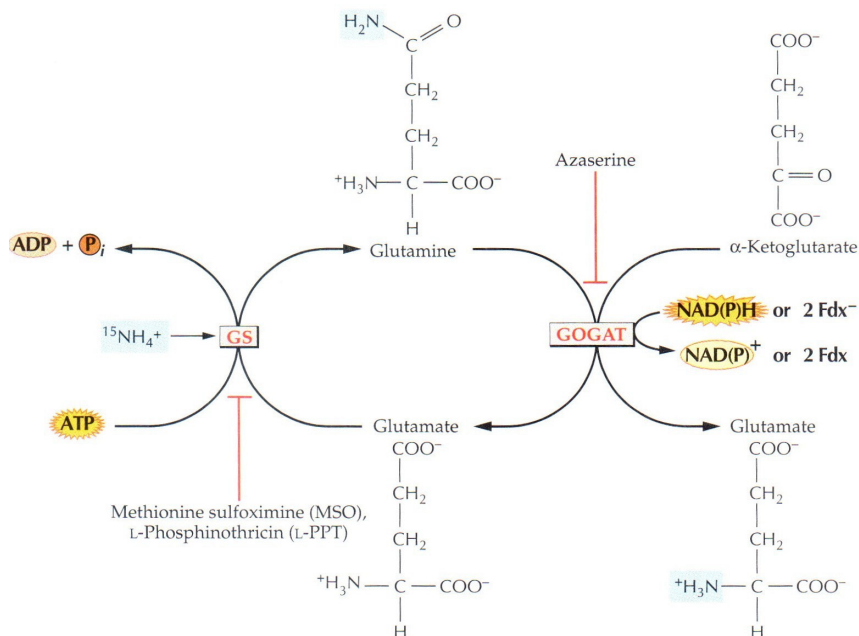
1.3 NADP-isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační)

1.3.1 Funkce a výskyt

Systematický název tohoto enzymu je isocitrát: NADP⁺ oxidoreduktasa (dekarboxylační). NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa katalyzuje oxidační dekarboxylaci isocitrátu na 2-oxoglutarát v přítomnosti NADP⁺, za vzniku CO₂ a NADPH [15]:



Syntéza 2-oxoglutarátu spojuje metabolismus uhlíku a dusíku, neboť v rostlinách tato oxokyselina slouží jako poskytovatel uhlíkové kostry pro asimilaci anorganického dusíku v tzv. GS/GOGAT cyklu. V tomto cyklu katalyzuje glutaminsyntetasa (GS, EC 6.3.1.2) kondenzaci amonného iontu a L-glutamátu za vzniku L-glutaminu. V druhém kroku je amidová skupina L-glutaminu pomocí glutamátsyntasy (GOGAT, EC 1.4.1.7 nebo EC 1.4.1.14) přenesena na 2-oxoglutarát za vzniku dvou molekul L-glutamátu (obr.č. 3). Ten je spolu s L-glutaminem využit pro syntézu dusíkatých látek jako jsou další aminokyseliny, chlorofyly a nukleové kyseliny [19]. Ve fyziologických procesech, které vyžadují syntézu velkého množství molekul obsahujících dusík je hlavním dodavatelem 2-oxoglutarátu právě ICDH.



Obr.č. 4: GS/GOGAT cyklus, pomocí kterého je v rostlinách asimilován anorganický dusík v podobě NH_4^+ iontů, které jsou vázány GS na L-glutamát za vzniku L-

glutaminu. Amidová skupina *L*-glutaminu je poté přenesena na 2-oxoglutarát za vzniku dvou molekul *L*-glutamátu [3].

Výskyt enzymu NADP-ICDH je široký, jeho přítomnost byla nalezena v mnoha organizmech včetně mikroorganismů, rostlin, živočichů i člověka. V buňkách vyšších rostlin byla aktivita tohoto enzymu nalezena a NADP-ICDH charakterizována v cytosolu, kde tvoří 90-100% aktivity detekované v rostlinných orgánech, dále v mitochondriích, chloroplastech [17], a peroxisomech [18].

NADP-ICDH byla izolována a charakterizována například v sazenicích borovice (*Pinus spp.*), kde byla přítomna pouze jedna izoforma, a to cytosolová. Enzym měl relativní molekulovou hmotnost 95 000 a vykazoval typickou kinetiku Michaelis-Mentenové s K_m 80 μ M pro isocitrát a 10 μ M pro NADP⁺ [19]. Dále byla cytosolová NADP-ICDH izolována z listů hrachu setého (*Pisum sativum* L.), měla relativní molekulovou hmotnost 90 000, K_m 23 μ M pro isocitrát a 10 μ M pro NADP⁺. Enzym vykazoval optimální aktivitu při pH 8,5 v přítomnosti Mg²⁺ a Mn²⁺ [20]. Izolace NADP-ICDH byla také provedena ze semen kukuřice seté (*Zea mays*). V tomto případě byly nalezeny dvě izoformy mitochondriální NADP-ICDH. Oba izoenzymy vykazovaly podobné kinetické vlastnosti. Hodnota K_m byla pro isocitrát pro obě izoformy stejná. Enzym měl molekulovou hmotnost 81 000 a pH optimum 7,4 [21].

1.3.2 Souvislost ze stresem

Úloha NADP-ICDH v rostlinných organizmech vystavených stresu byla vícekrát zkoumána na různých rostlinných modelech. Zvýšená aktivita NADP-ICDH a dalších enzymů produkujících NADPH byla pozorována v kořenech rostlin hrachu setého, které byly vystaveny oxidačnímu stresu. Oxidační stres v kořenech hrachu způsobuje inhibici fixace dusíku. Vzhledem k tomu, že byla zároveň pozorována snížená aktivita enzymů pentosového cyklu, NADP-ICDH pravděpodobně kompenzuje nedostatek NADPH v případě, že je pentosový cyklus je narušen [17] [22].

Studie provedená s rostlinami houseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) také poukázal na možnou roli NADP-ICDH v signalizaci rostlin po napadení patogenem [23].

Vliv hliníku a fosforu na aktivitu NADP-ICDH byl pozorován v rostlinách pomela (*Citrus grandis*). V listech rostlin vystavených zvyšujícím se dávkám fosforu nedošlo k výrazným změnám aktivity NADP-ICDH. V listech rostlin vystavených zvyšujícím se dávkám fosforu za přítomnosti hliníku byl zaznamenán nárůst aktivity tohoto enzymu se zvyšující se dávkou fosforu. V kořenech rostlin vystavených zvyšujícím se dávkám fosforu také nebyla zaznamenána výrazná změna aktivity NADP-ICDH, zato v kořenech vystavených také hliníku došlo k poklesu aktivity NADP-ICDH s narůstající koncentrací fosforu [24].

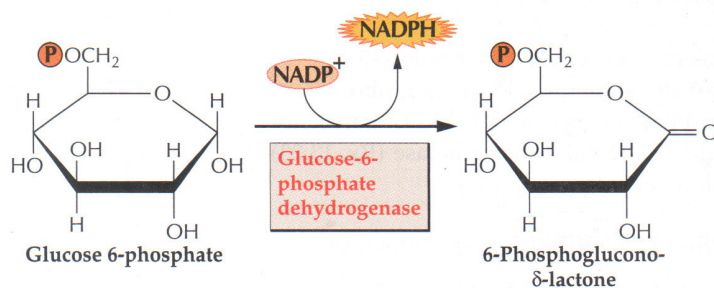
Dále byly účinky hliníku také zkoumány na kořenech fazole. V tomto případě bylo také zaznamenáno rapidní snížení aktivity NADP-ICDH v kořenech rostlin vystavených hliníku [25].

Rostliny fazole byly také použity při studiu účinků kadmia na aktivitu NADP-ICDH. V listech rostlin vystavených kadmiu došlo k nárůstu její aktivity, avšak v kořenech byl zaznamenán její pokles [26].

1.4 Glukosa-6-fosfatdehydrogenasa

1.4.1 Funkce a výskyt

Systematicky se tento enzym nazývá D-glukosa-6-fosfát:NADP⁺ 1-oxidoreduktasa. Jeho funkce je katalyzovat oxidativní přeměnu D-glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukono- δ -lakton v přítomnosti NADP⁺:



G6PDH má klíčovou úlohu v pentosovém cyklu, je prvním ze dvou enzymů generujících NADPH v tomto cyklu. Jelikož enzymová reakce katalyzovaná G6PDH probíhá v organizmech jenom v jednom směru, je považována za reakci limitující rychlost

celého cyklu [27]. Pentosový cyklus je v rostlinách významným zdrojem NADPH, ribulosa-5-fosfátu a erytroza-5-fosfátu, které se účastní syntézy nukleotidů, aromatických aminokyselin a mastných kyselin. G6PDH se také podílí na biosyntéze rostlinných hormonů, derivátů alkaloidů odvozených od histidinu a purinu a sekundárních metabolitů [6].

G6PDH se vyskytuje v mnoha organizmech ve všech říších, a to v cytoplazmě, chloroplastech a peroxisomech [6]. Izolace a charakterizace G6PDH byla provedena z listů koriandru setého (*Coriandrum sativum*). Enzym měl relativní molekulovou hmotnost 74 400, pH optimum 8,0 a optimální teplotu 30°C. Michaelisova konstanta tohoto enzymu pro D-glukosa-6-fosfát byla 0,116 mM a pro NADP⁺ 0,026 mM [28].

Izolace a charakterizace peroxisomální G6PDH byla provedena z listů hrachu. V peroxisomech byly nalezeny tři izoformy tohoto enzymu. G6PDH vykazovala typickou kinetiku Michaelis-Mentenové, relativní molekulová hmotnost tohoto enzymu byla 56 000 [29].

G6PDH byla také izolována z listů kukuřice seté. Izolace byla provedena ze zelených a z etiolovaných listů rostoucích ve tmě. Oba izoenzymy nalezené v těchto listech měly relativní molekulovou hmotnost jedné podjednotky 54 000, avšak lišily se v některých kinetických parametrech. G6PDH z etiolovaných listů měla K_m pro D-glukosa-6-fosfát 0,57 mM a pro NADP⁺ 0,008 mM. G6PDH ze zelených listů měla K_m pro D-glukosa-6-fosfát 0,33 mM a pro NADP⁺ 0,019 mM. Tyto dva enzymy se lišily také v izoelektrickém bodě, G6PDH z etiolovaných listů měla I_p 4,3 a ze zelených 4,9 [30].

1.4.2 Souvislost ze stresem

G6PDH je také často spojována s výzkumem působení stresu na rostliny. Změna její aktivity byla předmětem zkoumání například v klíčících semenech hrachu setého, vystavených kadmiu. Suchá semena vystavená kadmiu vykazovala drastické zpomalení růstu oproti kontrolním rostlinám a zároveň se v těchto semenech udržovala aktivita G6PDH na vyšší úrovni, naproti tomu v kontrolních rostlinách úplně vymizela po 5 dnech od začátku klíčení [31].

Aktivita G6PDH byla sledována i v souvislosti s obrannými reakcemi rostlin tabáku vůči infekci *Phytophthora nicotianae*. Rezistentní a vnímavá odrůda tabáku byla nakažena

tímto organizmem. U rezistentních rostlin bylo zaznamenáno výrazné zvýšení aktivity G6PDH oproti kontrolním rostlinám, u vnímavé odrůdy byl zaznamenán jenom malý nárůst aktivity tohoto enzymu. Zdá se tedy, že G6PDH je také významným faktorem i při biotickém stresu [32].

G6PDH byla také studována v rostlinách vystavených dlouhodobému stresu působenému vysokou koncentrací soli. Výsledky naznačují, že během tohoto stresu bylo NADPH produkované G6PDH spojeno s aktivitou oxidoreduktas plazmatické membrány, což mělo za důsledek akumulaci H_2O_2 . Ten slouží jako signál v regulaci G6PDH a enzymů glutathionového cyklu (obr.č. 2), pomocí kterého se zvýšila regenerace redukovaného glutathionu, významného antioxidantu. G6PDH má tedy kritickou roli v udržování stále hladiny redukovaného glutathionu v buňce během dlouhodobého vystavení rostliny solnému prostředí [33].

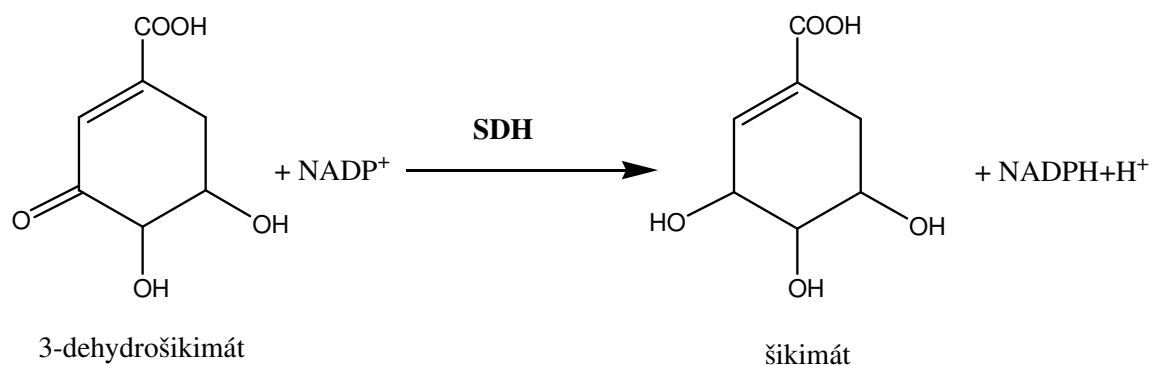
Účinek solného stresu byl také zkoumán v kořenech fazole. Zvýšení aktivity G6PDH v rostlinách vystavených soli naznačuje, že může mít také důležitou úlohu při adaptaci kořenů fazole slanému prostředí [34].

Nárůst aktivity G6PDH byl zaznamenán také v rostlinách *Boerhavia diffusa* L. a *Tabernaemontana divaricata* L. při výzkumu vlivu výfukových plynů na rostlinné organizmy [35].

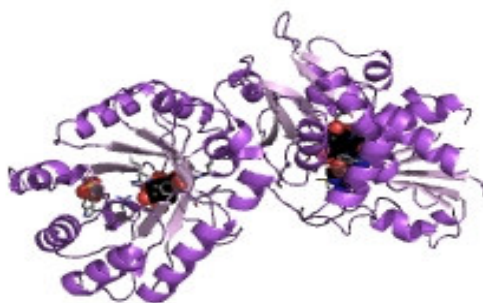
1.5 Šikimátdehydrogenasa

1.5.1 Funkce a výskyt

Systematický název tohoto enzymu je šikimát:NADP⁺ 3-oxidoreduktasa. V přítomnosti NADP⁺ katalyzuje vznik šikimátu ze 3-dehydrošikimátu [36]:



SDH je součástí šikimátového cyklu, který byl objeven jako cesta k syntéze aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu [36], ale poskytuje také prekursor pro biosyntézu sekundárních metabolitů, rostlinných hormonů, alkaloidů a vitaminů [6]. Tento cyklus byl nalezen pouze v rostlinách a mikroorganismech, výskyt u živočichů prokázán nebyl. SDH katalyzuje čtvrtou ze sedmi reakcí, které tvoří šikimátový cyklus [36]. U mikroorganismů je tento enzym monofunkční, v kvasinkách a plísniích je součástí pětifunkčního komplexu a u rostlin je sdružený s 3-dehydrochinátdehydratasou (EC 4.2.1.10 DHD) a tvoří tak bifunkční komplex 3-dehydrochinátdehydratasa/šikimátdehydrogenasa (DHD/SDH) (obr.č. 5).



Obr.č. 5: Model krystalové struktury bifunkčního komplexu 3-dehydrochinátdehydratasa/šikimátdehydrogenasa (DHD/SDH) izolovaného z houseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) [37].

SDH byla nalezena v mnoha rostlinných druzích a v různých rostlinných tkáních. V buňce je výskyt tohoto enzymu známý v plastidech, ale výzkum provedený na

transgenních rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) vedl k objevení tohoto enzymu také v dalších částech buňek. Transgenní rostliny se sníženou expresí DHD/SDH vykazovaly několik růstových defektů a kumulaci nejen substrátu ale i produktu, co vedlo k objevení cytosolové DHD/SHD. Vzhledem k tomu, že cytosolová DHD/SDH nebyla schopna doplnit ztrátu plastidového cyklu předpokládá se, že její funkce se *in vivo* od plastidové DHD/SDH liší [38].

Charakterizace a izolace SDH byla provedena například z listů čajovníku čínského (*Camellia sinensis* L.). Jeho zjištěné pH optimum bylo 10,1 v prostředí glycin-NaOH pufru a 7,7 v Tris-HCl pufru, K_m pro šikimát měla hodnotu 0,43 mM a pro NADP^+ 0,032 mM. Nejvyšší specifická aktivita tohoto enzymu byla naměřena v rostoucích mladých listech [39].

Izolace a charakterizace SDH byla také provedena ze semen papriky roční (*Capsicum annuum*), kde se podílí na syntéze sekundárních metabolitů, jako jsou lignin, flavonoidy a alkaloidy, ze kterých jsou pro pikantnost papriky nejdůležitější kapsaicinoidy. Purifikovaný enzym měl relativní molekulovou hmotnost 67 000, pH optimum bylo 10,5 a optimální teplota 50°C. Enzym vykazoval typickou kinetiku Michaelis-Mentenové s K_m 0,087 mM pro šikimát a 0,017 mM pro NADP^+ . Ionty Ca^{2+} , Mg^{2+} a Mn^{2+} SDH aktivovaly naproti tomu Zn^{2+} , Cu^{2+} působily jako inhibitory [40].

SDH byla zároveň izolována z dužiny okurky seté (*Cucumis sativa* L.). V tomto případě byla zjištěna relativní molekulová hmotnost 45 000, pH optimum 8,7 optimální teplota 50°C, K_m pro šikimat 0,06 mM a 0,01 mM pro NADP^+ [41].

U SDH izolované ze semen hrachu setého (*Pisum sativum*) byla zjištěna K_m pro šikimát 0,19 – 0,28 mM, pH optimum bylo 10,0 [43]. Dále byl tento enzym izolován z palmy assai (*Euterpe oleracea* mart.) [42].

SDH byla také součástí dalších výzkumů, jako například výzkumu aktivity enzymů účastnících se biosyntézy ligninu během stárnutí v kořenech brukve řepky (*Brassica napus*) v přítomnosti i nepřítomnosti ethylenu. Senescence i přítomnost ethylenu měly jen malý vliv na aktivitu SDH [44].

1.5.2 Souvislost ze stresem

Ve vícero případech bylo zjištěno, že změny v životním prostředí způsobující stres vyvolávají v rostlinných tkáních zvýšení aktivity enzymů šikimatového cyklu.

Aktivita SDH byla také zkoumána v rajčatech skladovaných při různých teplotách. Výrazné zvýšení aktivity SDH bylo pozorováno u plodů skladovaných při teplotě nižší, než je hraniční teplota způsobující poškození chladem (12 – 13°C) [41].

Při výzkumu působení methyljasmonátu a kyseliny salicylové na kořeny ženšenu pravého (*Panax ginseng*) byla aktivita SDH také zvýšena. U rostlin vystavených kyselině salicylové byl nárůst aktivity výraznější [45].

Zvýšená aktivita SDH spolu s nárůstem obsahu fenolů byla pozorována i v rostlinách heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*) vystavených kadmii, mědi a niklu. Zvýšená aktivita SDH byla pozorována vždy v listech. U rostlin vystavených kadmii a mědi byl nárůst aktivity výrazně vyšší než v rostlinách vystavených niklu [46] [47].

2 CÍL PRÁCE

1.) Z různých rostlin a jejich částí (plodů, listů a semen) vybrat takové, které mají vysokou aktivitu NADP-dependentních enzymů (NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH, SDH).

2.) Zvolit vhodnou modelovou rostlinu pro sledování vlivu abiotického stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů a vybrat vhodný zdroj pro purifikaci těchto enzymů.

3 METODY

3.1 Rostlinný materiál

Při provedení této práce byly použité tyto rostlinné materiály :

- a) Semena z lísky obecné *Corylus avellana*, ořešáku královského *Juglans regia*, podzemnice olejné *Arachis hypogaea*, borovice pinie *Pinus pinea*, mandloně obecné *Amygdalus communis*, pistácie pravé *Pistacia vera*, kokosovníku ořechoplodého *Cocos nucifera*, sezamu indického *Sesamum indicum*, prosa obecného *Panicum miliaceum*, máku setého *Papaver somniferum*, fazole zahradní *Phaseolus vulgaris*, hráchu setého *Pisum sativum*, čočky jedlé *Lens culinaris*, fazole mungo *Vigna radiata* merlíku chilského *Chenopodium quinoa*.
- b) Plody, respektive kořeny, cibule a hlízy: kořeny z mrkve obecné *Daucus carota*, petržle kořenové *Petroselinum crispum*, celeru bulvového *Apium graveolens* L., ředkve černé *Raphanus sativus* var. *Major*, ředkvičky seté letní *Raphanus sativus*, cibule z česneku kuchyňského *Allium sativum* a cibule seté *Allium cepa*, hlízy z bramboru hlíznatého *Solanum tuberosum* a kedlubny *Brassica oleracea* convar. *Gongylodes*, plody z okurky salátové *Cucumis sativa* L, papriky roční (červené, žluté, zelené) *Capsicum annuum*, rajčete jedlého *Solanum lycopersicum*, jabloně *Malus* odrůdy Gr. Smish, Idared a Golden delicious, hrušně *Pyrus*, jahody zahradní *Fragaria ananassa*, banánovníku *Musa*, pomerančovníku *Citrus sinensis*, tykve obecné *Cucurbita pepo* (cuketa), mandarinky *Citrus tangerina*, citronovníku *Citrus limon*, grapefruitu *Citrus paradisi*, citronovníku limetkového *Citrus aurantifolia*, révy vinné *Vitis vinifera*, aktinídie ovocné *Actinidia deliciosa* (kivi).
- c) Listy, stonky a výhonky: listy z leknínu *Nymphaea*, ječmene obecného *Hordeum vulgare* L., růžičkové kapusty *Brassica oleracea* convar. *Gemmifera*, olivníku evropského *Olea europaea*, česneku kuchyňského *Allium sativum*, cibule seté *Allium cepa*, mrkve obecné *Daucus carota*, fazole zahradní *Phaseolus vulgaris* L., hrachu setého *Pisum sativum* L., bramboru hlíznatého *Solanum tuberosum*; stonky z kokošky pastuší tobolky *Capsella bursa-pastoris*, poponce břechtanovitého *Glechoma hederacea* L., podbělu obecného *Tussilago farfara*, měrnice černé

Ballota nigra, smetánky lékařské *Taraxacum officinale*, jetelu lučního *Trifolium pratense*, řebříčku obecného *Achilles millefolium*, výhonky z okurky salátové *Cucumis sativa* L., papriky roční *Capsicum annuum*, rajčete jedlého *Solanum lycopersicum*, ředkvičky seté letní *Raphanus sativus*.

3.2 Použité chemikálie

2-amino-2-methyl-1-propanol, Sigma, USA
Bradfordovo činidlo, Sigma, USA
BSA, Sigma, USA
DTT, Sigma, USA
EDTA, Lachema, ČR
D-Glukosa-6-fosfát sodný, Sigma, USA
D, L-Isocitrát trisodný, Sigma, USA
L-malát sodný, Sigma, USA
MgCl₂, Sigma, USA
NADP⁺, Sigma, USA
PVP, Sigma, USA
Šikimát sodný, Sigma, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Sigma, USA

3.3 Použité přístroje

Analytické váhy XE Series 100A, Denver Instrument Company, USA
Centrifuga UNIVERSAL 32R, Hettich Zentrifugen, Německo
pH metr UB-10, Denver Instrument Company, USA
Spektrofotometr Helios α, Thermo Spectronic, USA
Spektrofotometr Ultrospec 2 100, Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

3.4 Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity

Navážku rostlinného materiálu jsem společně s extrakčním pufrům A homogenizovala ve třecí misce. Na 1 g navážky jsem přidala 3 ml extrakčního pufru A pro zelené rostliny, semena a ořechy a 1 ml extrakčního pufru pro plody ovoce a zeleniny. Extrakční pufr A obsahoval 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA a 5 mM MgCl_2 . K extraktům jsem přidala asi 0,02 g PVP na 1 ml extraktu a nechala jsem je centrifugovat 15 min při $16\,600 \times g$ a 4°C . Po ukončení centrifugace jsem pipetou odebrala supernatant, který jsem použila pro stanovení aktivit NADP-dependentních enzymů. Měření, u kterých byla zjištěna aktivita NADP-dependentních enzymů byla minimálně dvakrát opakována.

3.5 Stanovení enzymové aktivity

Aktivitu NADP-dependentních enzymů bylo možné sledovat díky faktu, že redukovaná forma koenzymu těchto enzymů (NADPH) má rozdílné absorpční spektrum ve srovnání s jeho oxidovanou formou (NADP^+), s výrazným absorpčním maximem při 340 nm [48].

3.5.1 Stanovení enzymové aktivity NADP-ME

Aktivitu NADP-ME jsem ve vzorku stanovila spektrofotometricky při 340 nm po dobu 5 minut 50 sekund v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pufru pH 7,4; 10 mM L- malát; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM NADP^+ . Reakce byla iniciována 50 μl rostlinného extraktu [10].

3.5.2 Stanovení enzymové aktivity NADP-ICDH

Aktivitu NADP-ICDH jsem ve vzorku stanovila spektrofotometricky při 340 nm po dobu 5 minut 50 sekund v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 2 mM D, L-isocitrát; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM NADP^+ . Reakce byla iniciována 50 μl rostlinného extraktu.

3.5.3 Stanovení enzymové aktivity G6PDH

Aktivitu G6PDH jsem ve vzorku stanovila spektrofotometricky při 340 nm po dobu 5 minut 50 sekund v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,6; 5 mM D-glukosa-6-fosfát; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM NADP^+ . Reakce byla iniciována 50 μl rostlinného extraktu.

3.5.4 Stanovení enzymové aktivity SDH

Aktivitu SDH jsem ve vzorku stanovila spektrofotometricky při 340 nm po dobu 5 minut 50 sekund v 1 ml reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru pH 9; 1 mM šikimát; 0,2 mM NADP^+ . Reakce byla iniciována 50 μl rostlinného extraktu.

Pro výše uvedené metody stanovení enzymové aktivity byly současně provedeny slepé pokusy, které měly stejné složení, avšak neobsahovaly koenzym NADP^+ , nebo substrát (L-malát, D-glukosa-6-fosfát, D,L- isocitrát, nebo šikimát). Případně byl výsledek měření o hodnotu těchto slepých pokusů redukován.

3.6 Stanovení obsahu bílkovin ve vzorku

Obsah bílkovin v jednotlivých rostlinných vzorcích jsem určila stanovením podle Bradfordaové [52]. Toto stanovení je založeno na posunu absorpčního maxima činidla Coomassie Briliant Blue G 250 ze 465 nm na 595 nm po vytvoření komplexu s proteiny.

Pro rostliny s nízkou aktivitou jsem použila 33,3 μl rostlinného extraktu, ke kterému jsem přidala 1 ml Bradfordova činidla. Vzorky s vyšší aktivitou jsem pro stanovení množství bílkovin ředila 3x. Směsi jsem promíchala a nechala reagovat po dobu 20 minut. Poté jsem je změřila oproti slepému vzorku obsahujícímu 33,3 μl destilované vody. Množství bílkovin pak bylo odečteno z kalibrační přímky, vytvořené pomocí standardního proteinu BSA o koncentraci 0 – 1,4 mg/ml.

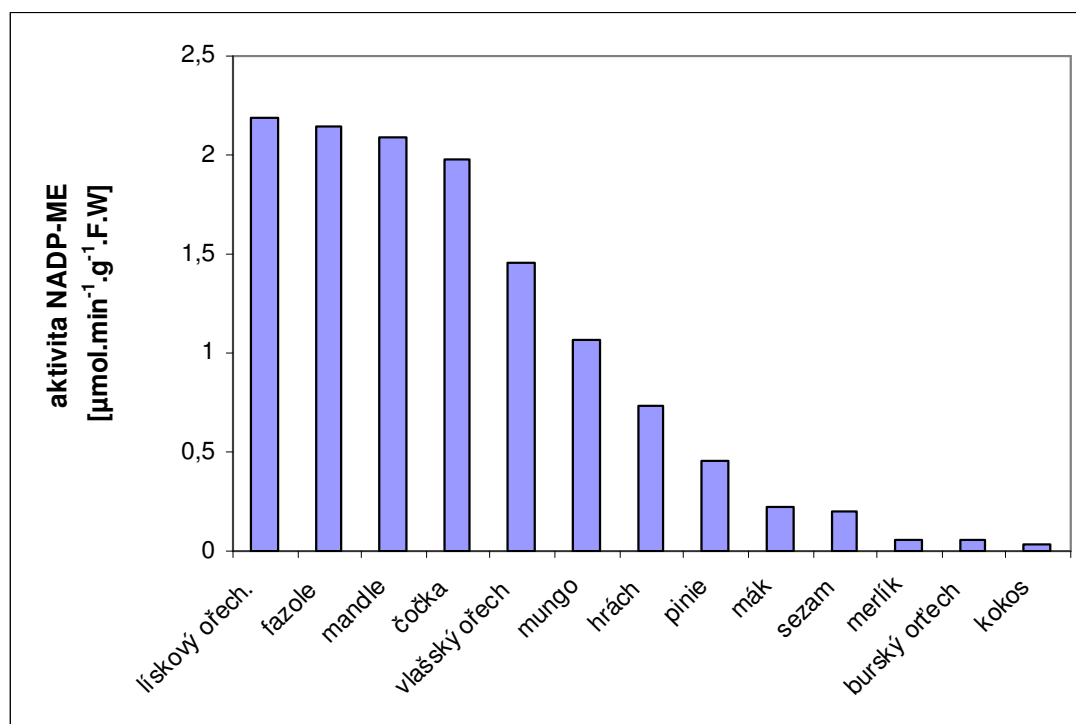
4 VÝSLEDKY

Jako potenciální zdroj studovaných enzymů (NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH a SHD) byly zvoleny jednak semena různých rostlin, která jsou všeobecně známá jako bohatý zdroj proteinů, jednak plody, kořeny a hlízy rostlin, kde se rovněž mohou tyto enzymy uplatňovat a v neposlední řadě listy a stonky, nejvhodnější část rostliny pro studium obranných odpovědí rostliny vůči stresu.

4.1 Porovnání aktivity NADP-ME v jednotlivých skupinách rostlin

4.1.1 Aktivita NADP-ME v semenech

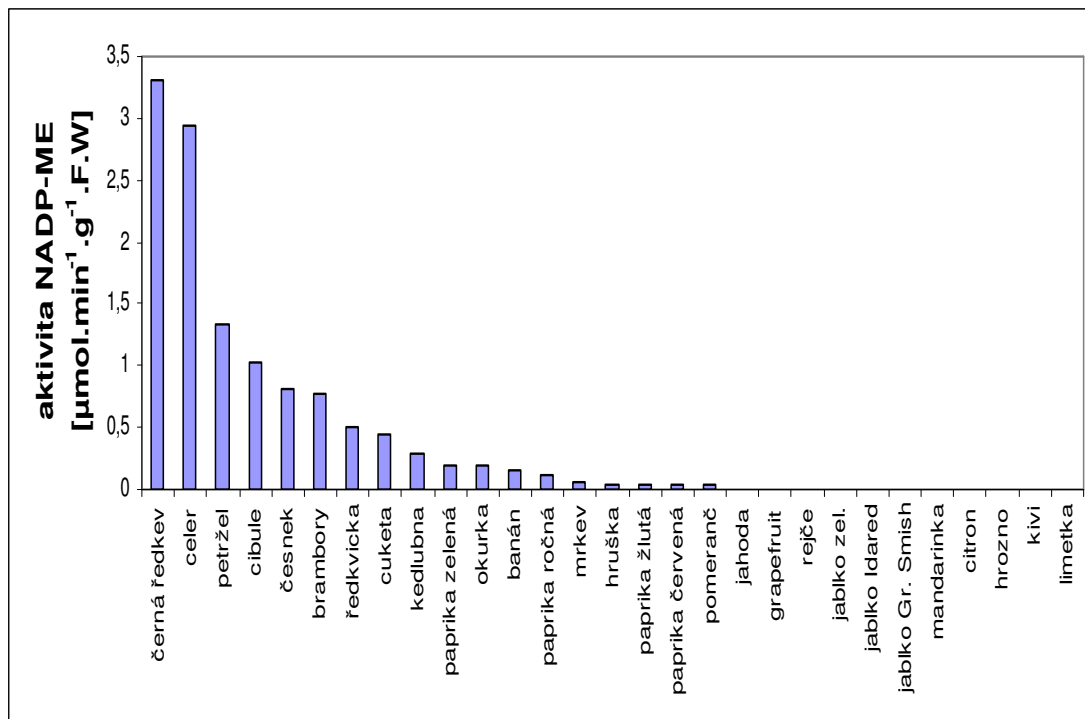
Na obr.č. 6 jsou porovnány aktivity NADP-ME v semenech zkoumaných rostlin. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu. Z obrázku vyplývá, že dobrým zdrojem tohoto enzymu jsou lískové ořechy, fazole, mandle, čočka, ale také vlašské ořechy, mungo či hrách.



Obr.č. 6: Aktivita NADP-ME v semenech vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.1.2 Aktivita NADP-ME v plodech, kořenech, cibulích a hlízách

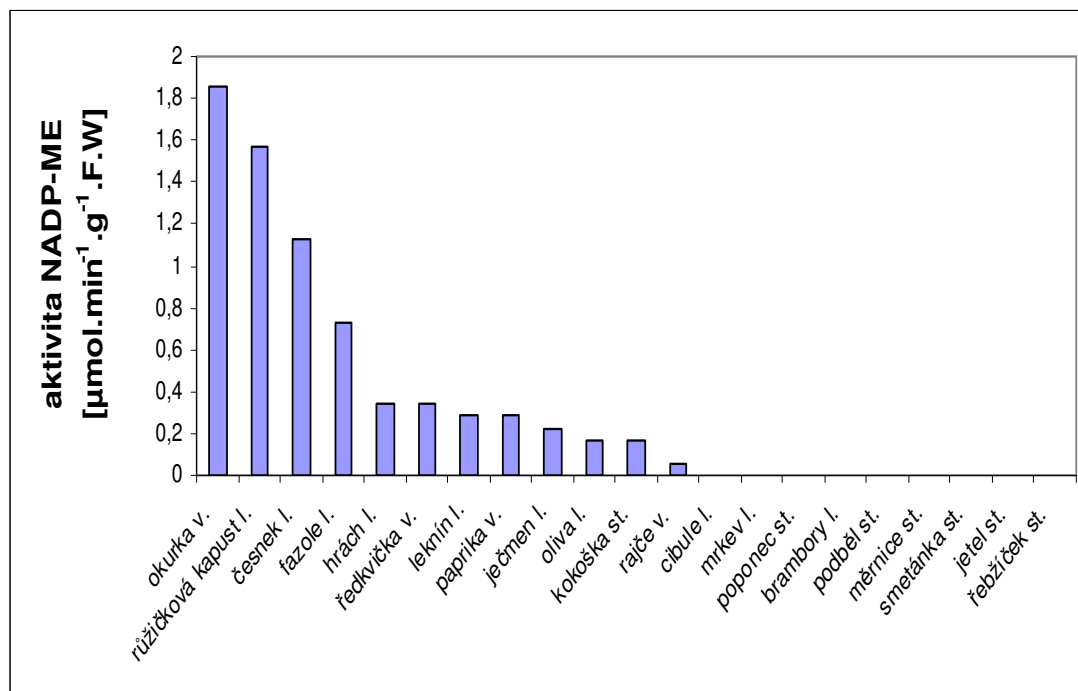
Obr.č. 7 znázorňuje zastoupení NADP-ME ve skupině obsahující plody, kořeny, cibule a hlízy vybraných rostlin. Výsledky jsou taktéž vztaženy na čerstvou hmotnost použitého rostlinného materiálu. Nejvyšší aktivitu v této skupině a zároveň i v rámci všech skupin měla černá ředkve. Bohatým zdrojem je i celer, petržel a cibule.



Obr.č. 7: Aktivita NADP-ME v plodech, kořenech, cibulích a hlízách vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.1.3 Aktivita NADP-ME v listech, stoncích a výhoncích

Jak je patrné z obr.č.8 str. 23, ve skupině listů, stonků a výhonků byly nejbohatším zdrojem NADP-ME sazenice okurky společně s listy růžičkové kapusty, česneku a fazole. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

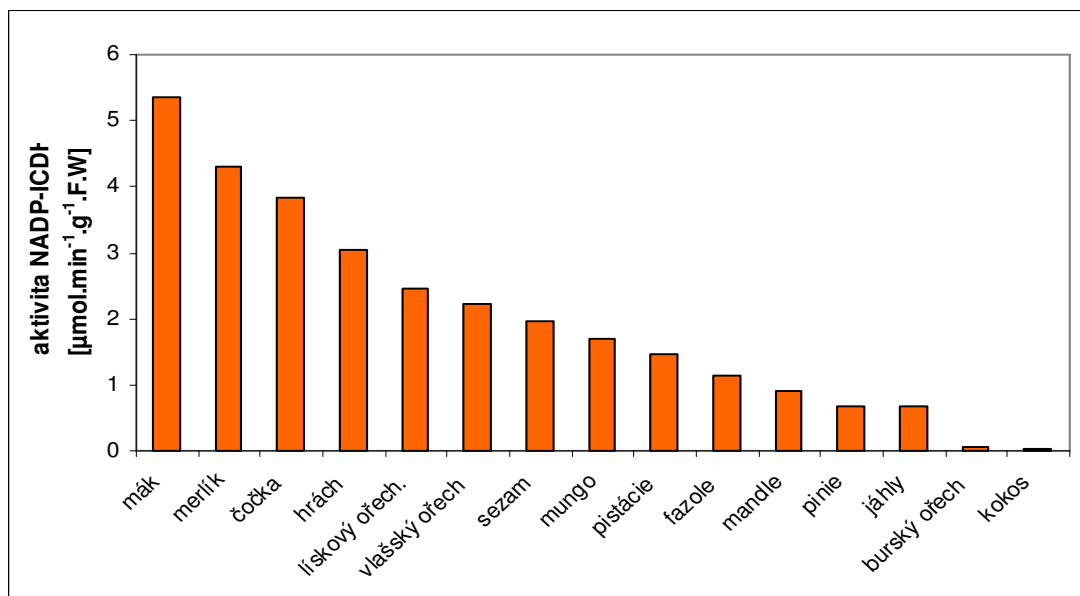


Obr.č. 8: Aktivita NADP-ME listech (l.), stoncích (st.) a výhoncích (v.) vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.2 Porovnání aktivity NADP-ICDH v jednotlivých skupinách rostlin

4.2.1 Aktivita NADP-ICDH v semenech

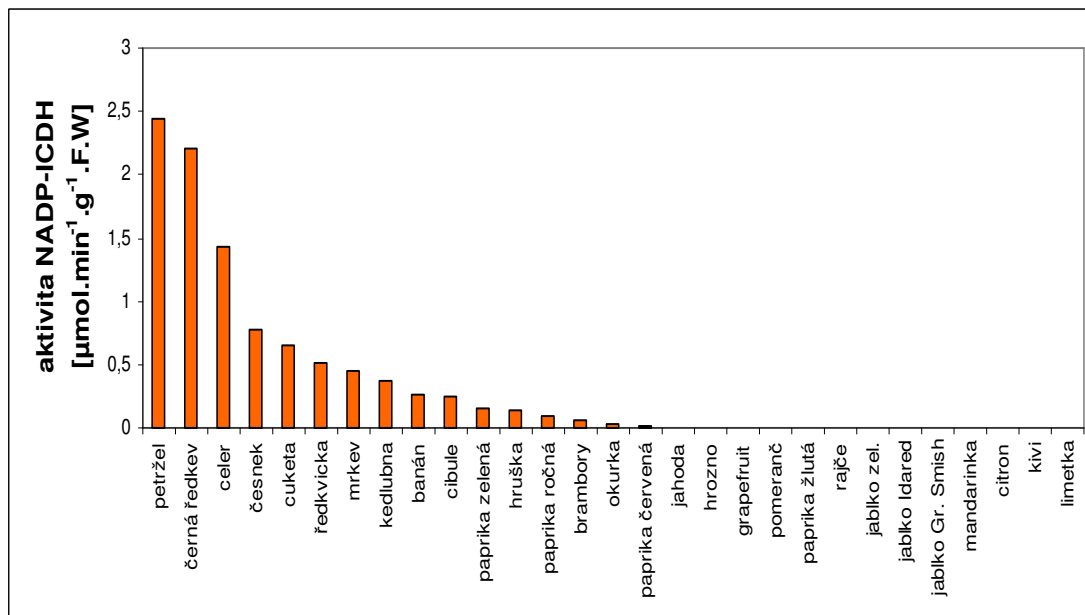
Na obr.č. 9 str. 24 je znázorněno zastoupení aktivit NADP-ICDH v rámci vybraných semen. Téměř všechna zkoumaná semena v této skupině vykazovala poměrně vysokou aktivitu, avšak nejvyšší aktivitu ve skupině a zároveň i ve všech skupinách měly mák, merlík chilský a čočka. Relativně vysokou aktivitu NADP-ICDH měl také hrách, lískový, či vlašský ořech. Výsledky u všech grafů jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.



Obr.č. 9: Aktivita NADP-ICDH v semenech vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.2.2 Aktivita NADP-ICDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách

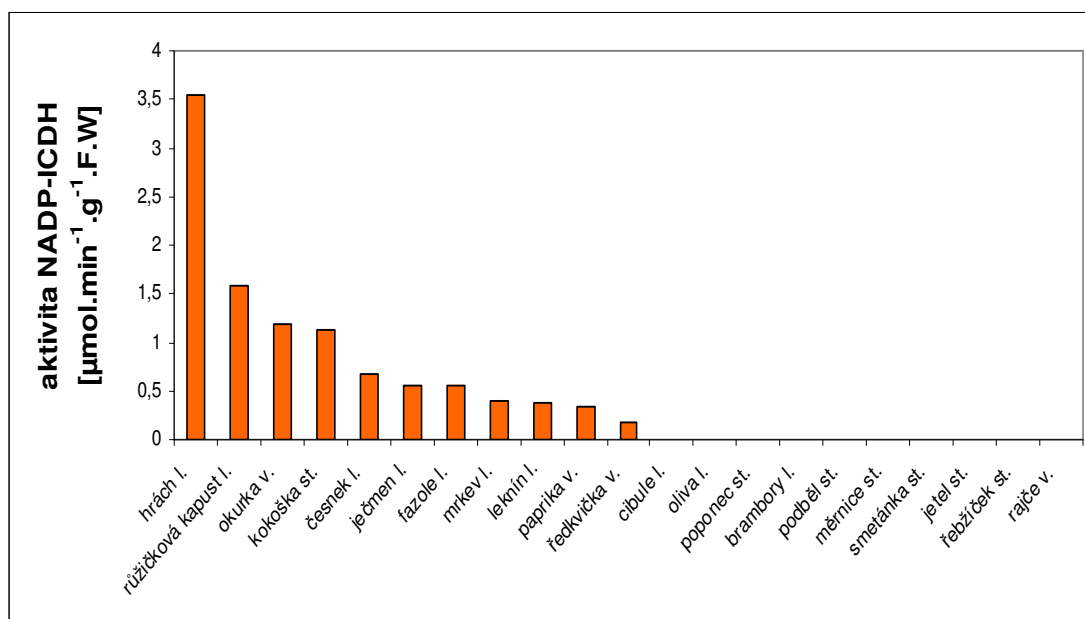
Z obr.č. 10 vyplývá, že ve skupině plodů, kořenů, cibulí a hlíz byla nejvhodnějším zdrojem NADP-ICDH petržel společně s černou ředkví a celerem.



Obr.č. 10: Aktivita NADP-ICDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.2.3 Aktivita NADP-ICDH v listech, stoncích a výhoncích

Z porovnání aktivit NADP-ICDH ve této skupině rostlin znázorněného na obr.č. 11 je patrné, že nejvyšší aktivitu vztaženou na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v této skupině měly listy hrachu, růžičkové kapusty a okurky.

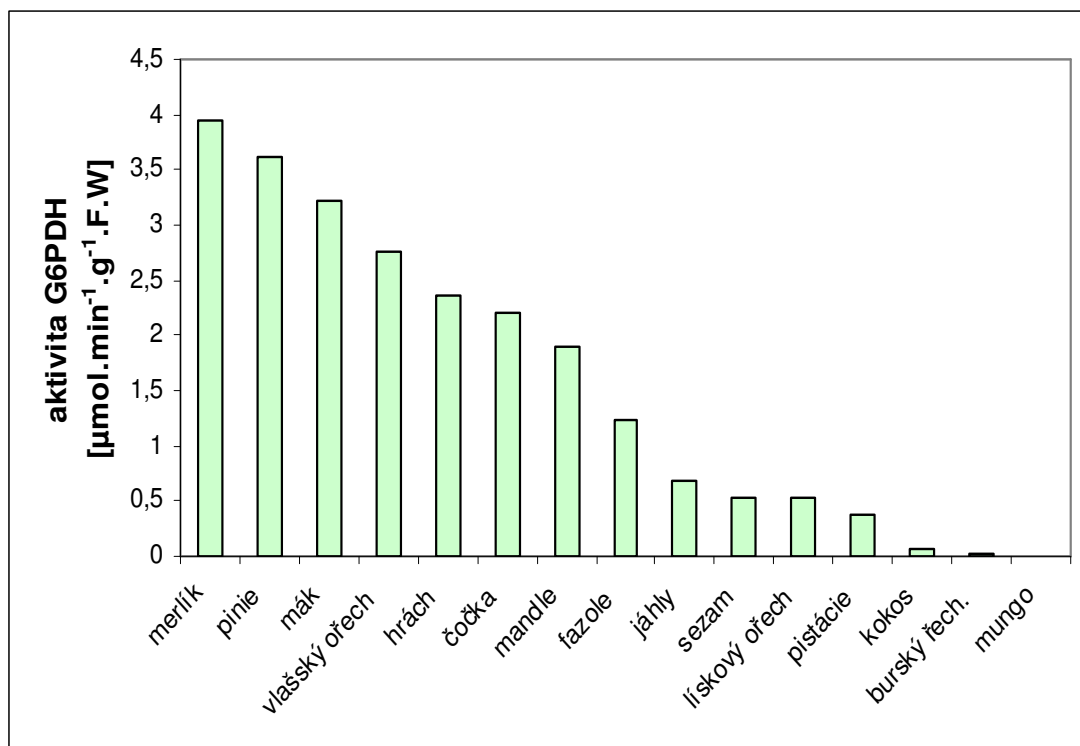


Obr.č. 11: Aktivita NADP-ICDH listech (l.), stoncích (st.) a výhoncích (v.) vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.3 Porovnání aktivity G6PDH v jednotlivých skupinách rostlin

4.3.1 Aktivita G6PDH v semenech

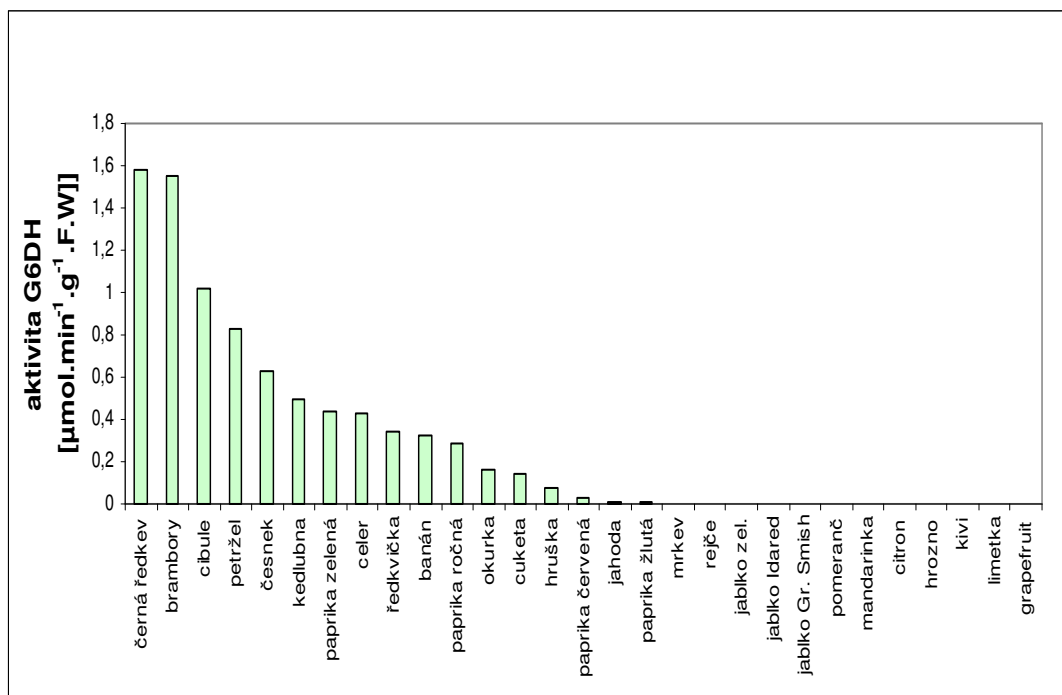
Porovnání aktivit G6PDH v rámci skupin ukázalo, že i pro tento enzym mají semena nejvyšší aktivitu vztaženou na čerstvou hmotnost. Jedná se zejména o merlík chilský, pinii či mák. Z obr.č. 12 str. 26 je zároveň patrné, že aktivita tohoto enzymu je relativně vysoká u většiny testovaných semen.



Obr.č. 12: Aktivita G6PDH v semenech vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.3.2 Aktivita G6PDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách

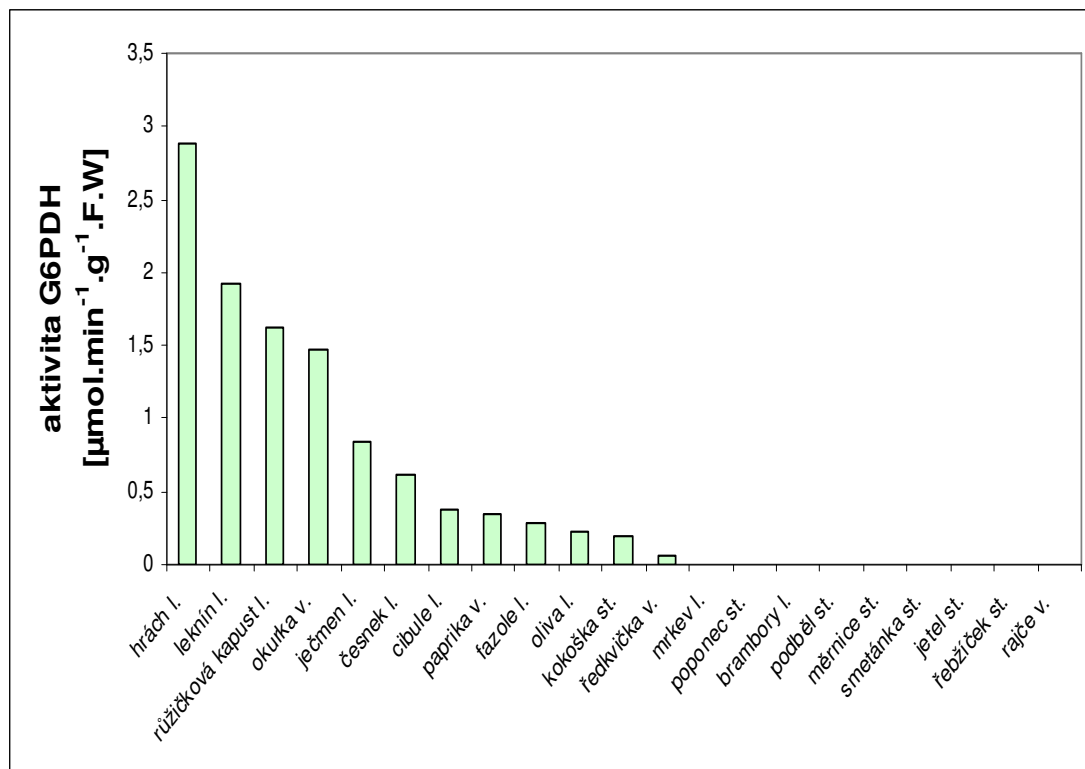
V plodech, kořenech, cibulích a hlízách měla nejvyšší aktivitu G6PDH černá ředkev společně s bramborem a petrželí (obr.č. 13, str. 27).



Obr.č. 13: Aktivita G6PDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.3.3 Aktivita G6PDH v listech, stoncích a výhoncích

Obr.č. 14 str. 28 znázorňuje porovnání aktivit G6PDH v listech, stoncích a výhoncích, kde nejvyšší měly listy hrachu, leknínu a růžičkové kapusty.

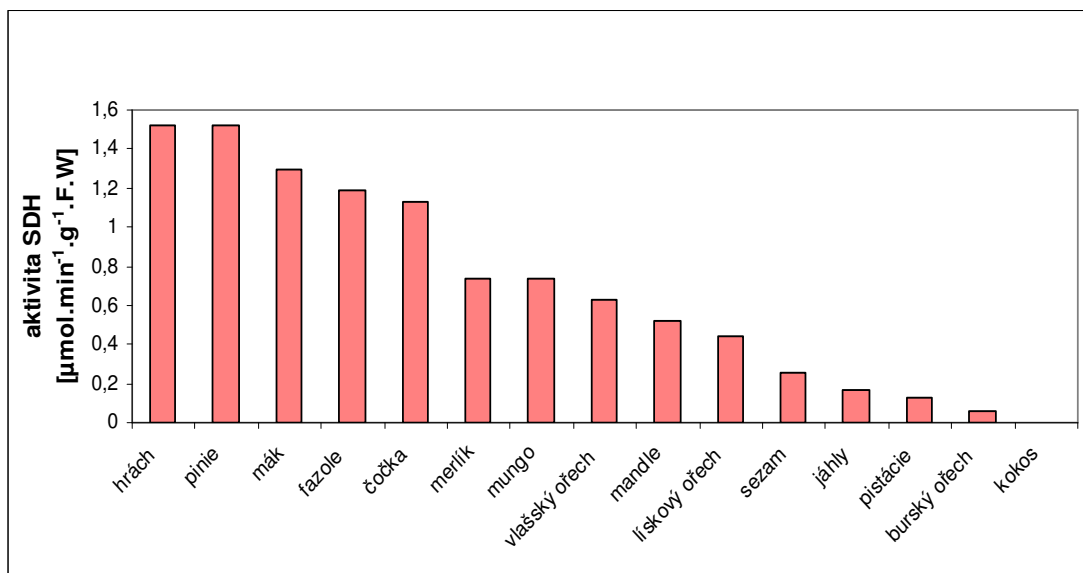


Obr.č. 14: Aktivita G6PDH listech (l.), stoncích (st.) a výhoncích (v.) vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.4 Porovnání aktivity SDH v jednotlivých skupinách rostlin

4.4.1 Aktivita SDH v semenech

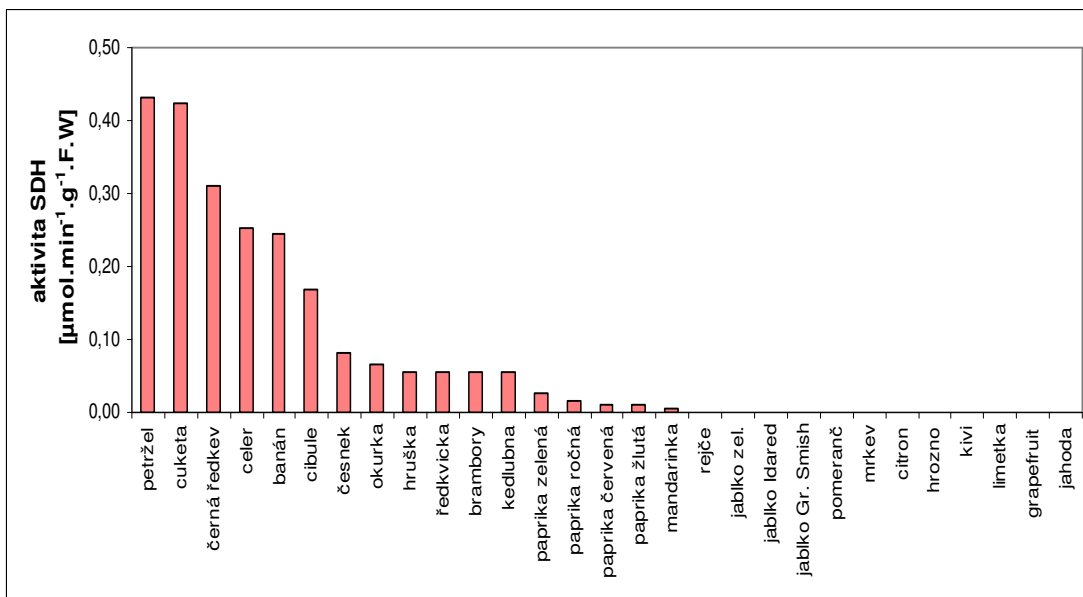
Na obr.č. 15 str. 29 je znázorněné zastoupení aktivity SDH v semenech. Nejvyšší aktivitu měla semena hrachu, pinie a máku. Vysoká aktivita byla naměřena také u fazole, čočky a merlíku chilského. Semena zároveň opět měla nejvyšší aktivitu v rámci všech testovaných skupin.



Obr.č. 15: Aktivita SDH v semenech vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.4.2 Aktivita SDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách

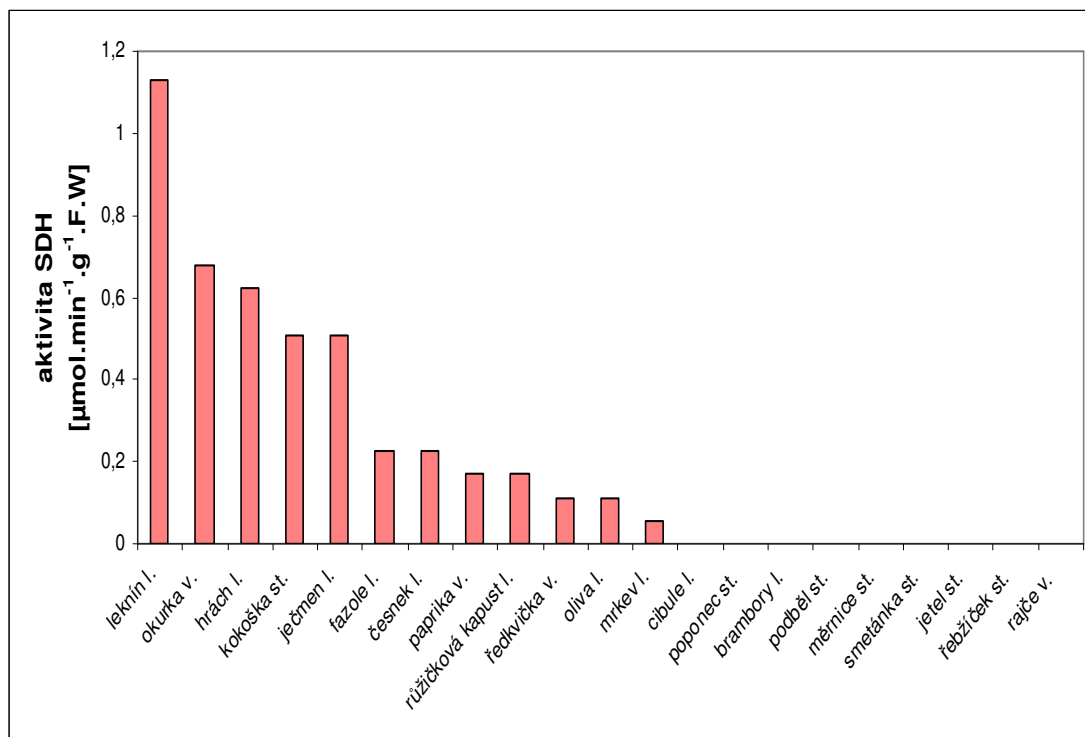
Obrázek č. 16 ukazuje, že u skupiny plodů, kořenů, cibulí a hlíz byla nejvyšší aktivita SDH naměřena u petržele, cukety a černé ředkve. V porovnání s ostatními skupinami však aktivity v této skupině dosáhly nejnižších hodnot.



Obr.č. 16: Aktivita SDH v plodech, kořenech, cibulích a hlízách vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.4.3 Aktivita SDH v listech, stoncích a výhoncích

Na obrázku č. 17 jsou porovnány aktivity SDH v listech, stoncích a výhoncích. Výrazně vyšší oproti ostatním v této skupině byla aktivita SDH leknínu.



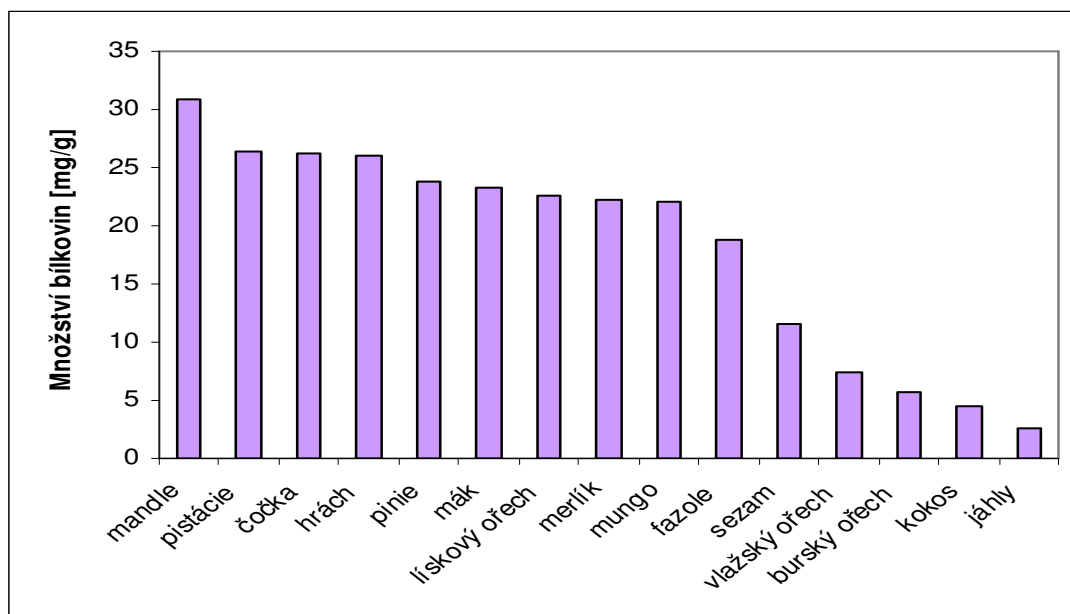
Obr.č. 17: Aktivita SDH listech (l.), stoncích (st.) a výhoncích (v.) vybraných rostlin vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

Ze všech použitých rostlin semena fazole, fazole mungo, hrachu, máku, merlíku chilského, borovice pinie, čočky a plod banánovníku vykazovaly enzymatickou aktivitu už v slepém vzorku, o kterou byly tedy redukovány.

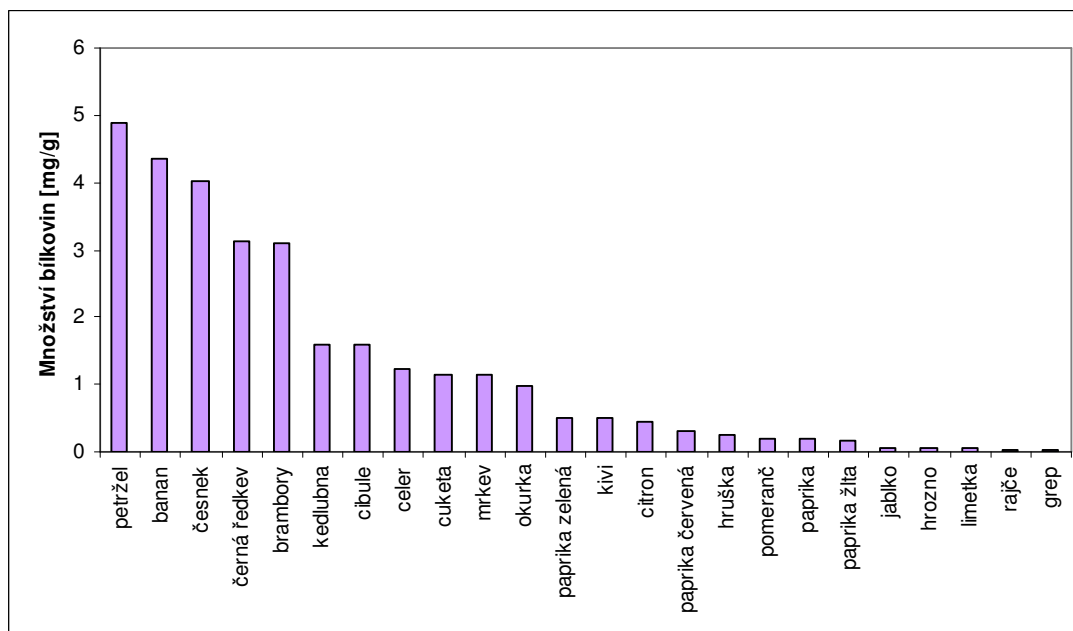
4.5 Obsah bílkovin v rostlinných extraktech

Obr.č. 18, 19 str. 31 a 20 str. 32 znázorňují koncentraci proteinů v jednotlivých skupinách rostlinných vzorků vyjádřených v mg/g čerstvé hmotnosti stanovených podle Bradfordové. Podle očekávání bylo největší množství rozpustných bílkovin zjištěno v semenech, konkrétně mandloně obecné, pistácie pravé a čočky jedlé (obr.č. 18). Ve skupině plodů, hlíz a kořenů byl nevyšší obsah bílkovin v kořenech petržele, v banánu

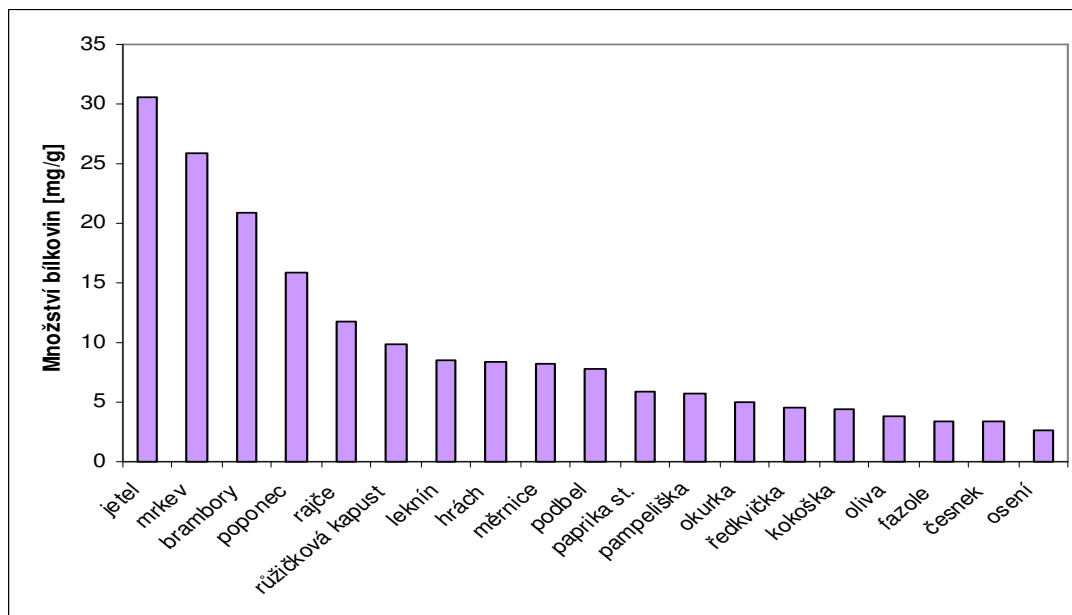
(plodu) a česneku (obr.č. 19), v další skupině pak v listech jetele, mrkve a bramboru (obr.č. 20).



Obr.č. 18: Obsah rozpustných bílkovin v semenech vybraných rostlin stanovený dle Bradfordové.



Obr.č. 19: Obsah rozpustných bílkovin v plodech, kořenech, cibulích a hlízách vybraných rostlin stanovený dle Bradfordové.



Obr.č. 20: Obsah rozpustných bílkovin v listech (l.), stoncích (st.) a výhoncích (v.) vybraných rostlin stanovený dle Bradfordové.

5 DISKUSE

Hospodářské plodiny jsou čím dál víc vystavovány různým druhům stresu, což se každoročně odráží na hospodářských výnosech. Porozumění mechanismu obranných reakcí, kterými rostliny odpovídají na nepříznivé životní podmínky, jako je vystavení suchu, vlivu těžkých kovů či různých virových i bakteriálních infekcí, by mohlo výrazně pomoci k vyšlechtění takových odrůd, které by stresu odolávaly snadněji.

Je známo že jedním z faktorů, které se podílejí na obranném systému rostlin jsou NADP-dependentní enzymy poskytující NADPH [1], [2], [4], [49]. Dostupnost redukčních ekvivalentů v buňce ve formě NADPH je nezbytná pro řadu biosyntetických procesů (biosyntézu mastných kyselin, hexos, osmoticky aktivních látek, sekundárních metabolitů), které mohou být v podmínkách stresu více potřebné. Dále je také NADPH vyžadováno askorbát-glutathionovým cyklem, zajišťujícím obranu před oxidativním poškozením vznikajícím po působení řady stresových faktorů [49]. Cílem této bakalářské práce bylo porovnat aktivity vybraných NADP-dependentních enzymů (NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH a SHD) v rostlinách a jejich částech, najít vhodnou modelovou rostlinu pro další výzkum aktivity těchto enzymů v rostlinách pod vlivem stresu a vhodný zdroj těchto enzymů pro jejich purifikaci. Aktivita daných enzymů byla stanovována spektrofotometricky při 340 nm v hrubém extraktu studovaných rostlin. Přehled rostlin, které vykazovaly nejvyšší aktivitu je shrnutý v tabulce č. 1 str. 34.

Skupina	Rostliny s nejvyšší aktivitou NADP-ME	Rostliny s nejvyšší aktivitou ICDH	Rostliny s nejvyšší aktivitou G6PDH	Rostliny s nejvyšší aktivitou SDH
Semena	líška obecná fazole zahradní mandloň obecná	mák setý merlík chilský čočka jedlá	merlík chilský borovice pinie mák setý	hrách setý borovice pinie mák setý
Plody, kořeny, cibule a hlízy	ředkev černá celer bulvový petržel kořenová	petržel kořenová ředkev černá celer bulvový	ředkev černá brambor hlíznatý cibule setá	petržel kořenová tykev obecná ředkev černá
Listy, stonky a výhonky	okurka salátová růžičková kapusta česnek kuchyňský	hrách setý růžičková kapusta okurka salátová kokoška pastuší tobolka	hrách setý leknín růžičková kapusta	leknín, okurka salátová hrách setý kokoška pastuší tobolka

Tabulka č. 1: Přehled rostlin sledovaných v této práci, která vykazovala nejvyšší aktivitu vybraných NADP-dependentních enzymů v rámci jednotlivých studovaných rostlinných skupin.

Z výsledků vyplývá, že pro purifikaci studovaných NADP-dependentních enzymů by byla nejvhodnější semena lísky obecné, máku setého, merlíku chilského, nebo hrachu setého, u kterých bylo dosaženo aktivity NADP-ME až $2,2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 6, str. 21), NADP-ICDH až $5,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 9, str. 24), G6PDH až $3,9 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 12, str. 26), SDH až $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 15, str. 29). Semena jsou všeobecně známá jako bohatý zdroj proteinů. Izolovaný protein by poté mohl sloužit k přípravě protilátek, případně ke studiu krystalové struktury. NADP-dependentní enzymy už byly izolovány například z listů rostliny *Aptenia cordifolia*

(NADP-ME) [8], z sazenic borovice [20], z listů hrachu setého [20], kukuřice seté (NADP-ICDH) [21], z listů koriandru setého [28], z listů hrachu (G6PDH) [29], tabáku [38], čajovníku čínského [39], papriky roční [40], z dužiny okurky seté [41], z palmy assaia [42] a brukve řepky [44] (SDH). V naší laboratoři byla například semena kukuřice použita pro izolaci a charakterizaci nefotosyntetické PEPC [50], nebo pro přípravu králičích protilátek proti NADP-ME [51]. Pro izolaci by mohly být použity i plody, kořeny, cibule, nebo hlízy. V této skupině se zdá být nejvhodnější ředkev černá nebo petržel kořenová, kde aktivita dosahuje u NADP-ME až $3,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 7, str. 22), G6PDH až $1,6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 13, str. 27), NADP-ICDH až $2,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 10, str. 24), SDH až $0,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 16, str. 29). V případě, že by se sledované NADP-dependentní enzymy měly purifikovat z jednoho zdroje, pak by nejvhodnější byly kořeny ředkve černé (viz tabulka č. 1 str. 34).

Třetí skupina zahrnující listy a stonky měla sloužit k výběru vhodné modelové rostliny pro studium odpovědi vůči stresu. Mělo by se jednat o rostlinu s vysokou aktivitou NADP-dependentních enzymů, s krátkou dobou klíčení, snadno se regenerujícími listy, případně o rostlinu suchomilnou a vodomilnou, neboť bude dále vyžita pro sledování vlivu abiotického stresu způsobeného především stresem ovlivňujícím obsah vody v rostlině (sucho, chlad, vysoká koncentrace soli). V této skupině byly vybrány okurka salátová, hrách setý, nebo leknín, kde aktivita dosahuje u NADP-ME až $1,9 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 8, str. 23), NADP-ICDH až $3,6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 11, str. 25), G6PDH až $2,9 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 14, str. 28), SDH až $1,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{F.W.}$ (obr.č. 17, str. 30). Ze suchomilných rostlin by vyhovovaly listy kokošky pastuší tobolky, která sice měla nižší, ale dostačující aktivitu G6PDH a NADP-ME, ale poměrně vysokou aktivitu NADP-ICDH a SDH.

Ačkoliv byly obranné reakce a způsob přizpůsobování se rostlin ztíženým životním podmínkám předmětem už vícero studií, mechanismy těchto procesů ještě stále nejsou úplně objasněny, proto je nezbytné pokračovat v jejich objasňování.

6 ZÁVĚR

1.) V rostlinných extraktech z 15-ti různých semen, 24 plodů, kořenů, cibulí, nebo hlíz a 19-ti různých listů, nebo stonků byla zjišťována a porovnávána aktivita vybraných NADP-dependentních enzymů (NADP-ME, ICDH, G6PDH, SDH).

2.) Jako zdroj pro purifikaci NADP-ME byly vybrány kořeny ředkve černé. Pro purifikaci ICDH byla vybrána semena máku setého, případně merlíku chilského, pro purifikaci G6PDH byla vybrána semena z merlíku chilského a pro izolaci SDH byla vybrána semena hrachu setého. V případě, že by se sledované NADP-dependentní enzymy měly purifikovat z jednoho zdroje, pak by nejvhodnější byly kořeny ředkve černé.

3) Z testovaných rostlin byly pro pokusy sledování vlivu abiotického stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů vybrány okurka salátová, hrách setý, nebo leknín jako vodomilné rostliny a kokoška pastuší tobolka jako rostlina suchomilná.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Noctor, G.: *Plant Cell Environ.* 29, 409-425 (2006)
- [2] Mateos, R.M., Bonilla-Valverde, D., del Río, L.A., Palma, J.M., Corpas, F.J.: *Physiol. Plant.* 135, 130-139 (2009)
- [3] Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
- [4] Edwards, G., Andreo, C.S.: *Phytochemistry* 31, 1845-1857 (1992)
- [5] Casati, P., Drincovich, M.F., Edwards, G.E., Andreo, C.S.: *Photosynth. Res.* 61, 99-105 (1999)
- [6] <www.brenda-enzymes.org>, staženo dne 1.6.2010
- [7] Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S.: *FEBS Lett.* 490, 1-6 (2001)
- [8] Ferreyra, M.L.F., Andreo, C.S., Podestá, F.E.: *Plant Sci.* 164, 95-102 (2003)
- [9] Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J.: *Plant Physiol. Bioch.* 43, 437-444 (2005)
- [10] Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čěřovská, N.: *Photosynthetica* 41, 357-363 (2003)
- [11] Doubnerová, V., Müller, K., Čěřovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3583-3598 (2009)
- [12] Saher, S., Fernández-García, N., Piqueras, A., Hellín, E., Olmos, E.: *Plant Physiol. Bioch* 43, 573-582 (2005)
- [13] Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., von Korff, M., Varshney, R.K., Grandner, A., Valkoun, J.: *J. Exp. Bot.* 60, 3531-3544 (2009)
- [14] Crecelius, F., Streb, P., Feierabend, J.: *J. Exp. Bot.* 54, 1075-1083 (2003)
- [15] Alvarado, A., Flores, M.E.: *Biotechnol. Lett.* 25, 1175-1178 (2003)
- [16] Wedding, R.T.: *Plant Physiol.* 90, 367-371 (1989)
- [17] Gálvez, L., González, E.M., Arrese-Igor, C.: *J. Exp. Bot.* 56, 2551-2561 (2005)
- [18] Corpas, E.J., Barroso, J.B., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Lupiáñez, J.A., del Río, L.A.: *Plant Physiol. Bioch.* 121, 921-928 (1999)
- [19] Palomo, J., Gallardo, F., Suárez, M.F., Cánovas, F.M.: *Plant Physiol.* 118, 617-626 (1998)
- [20] Ni, W., Robertson, E.F., Reeves, H.C.: *Plant Physiol.* 83, 785-788 (1987)

- [21] Curry, R.A., Ting, I.P.: Arch. Biochem. Biophys. 176, 501-509 (1976)
- [22] Marino, D., González, E.M., Fernando, P., Puppo, A., Arrese-Igor, C.: Planta 225, 413-421 (2007)
- [23] Mhamdi, A., Mauve, C., Houda, G., Saindrenan, P., Hodges, M., Noctor, G.: Plant Cell Environ. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02133.x (2010)
- [24] Chen, L., Tang, N., Jiang, H., Yang, L., Li, Q., Smith, B.R.: J. Plant Physiol. 166, 2023-2034 (2009)
- [25] Rangel, A.F., Rao, I.M., Braun, H.P., Horst, W.J.: Physiol. Plantarum 138, 176-190 (2010)
- [26] Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Ghorbal, M.H.: J. Plant Physiol. 160, 367-376 (2002)
- [27] Huang, J., Zhang, H., Wang, J., Yang, J.: Mol. Biol. Rep. 30, 223-227 (2003)
- [28] Demir, H., Beydemir, S., Cifci, M., Küfrevioğlu, Ö.: J. Food Biochem. 28, 155-168 (2004)
- [29] Corpas, F.J., Barroso, J.B., Sandalio, L.M., Distefano, S., Palma, J.M., Lupianez, J.A., del Rio, L.A.: Biochem. J. 330, 777-784 (1998)
- [30] Valenti, V., Stanghellini, M.A., Puppilo, P.: Plant Physiol. 75, 521-526 (1984)
- [31] Smiri, M., Chaoui, A., Ferjani, E.: J. Plant Physiol. 166, 259-269 (2009)
- [32] Sharte, J., Schön, H., Tjaden, Z., Wels, E., von Schaewen, A.: P. Natl. Acad. Sci. USA 106, 8061-8066 (2009)
- [33] Wang, X., Ma, Y., Huang, Ch., Li, J., Wan, Q., Bi, Y.: Plant Signal. Behav. 3, 394-395 (2008)
- [34] Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., Bi, Y.: Plant Cell Physiol. 43, 511-522 (2007)
- [35] Mandal, M.: J. Environ. Biol. 27, 43-47 (2006)
- [36] Herrmann, K.M.: Plant Cell 7, 907-919 (1995)
- [37] <<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/2o7s>>, staženo dne 1.6.2010
- [38] Ding, L., Hofius, D., hajirezaei, M.R., Fernie, A.R., Börnke, F., Sonnewald, U.: J. Exp. Bot. 58, 2053-2067 (2007)
- [39] Sanderson, G.W.: Biochem. J. 98, 248-252 (1966)
- [40] Díaz, J., Merino, F.: Physiol. Plantarum 100, 147-152 (1997)
- [41] Lourenco, E.J., Lemos Silva, G.M., Neves, V.A.: J. Agric. Food Chem. 39, 458-462 (1991)
- [42] Lemos Silva, G.M., Lourenco E.J., Neves, V.A.: J. Food Chem. 9, 105-116 (1985)

- [43] Balinsky, D., Davies, D.D.: *Biochem. J.* 80, 292-296 (1961)
- [44] Rhodes, M.J.C., Charles, A., Hill, R., Woollorton, S.C.: *Phytochemistry* 15, 707-710 (1976)
- [45] Ali, M.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y.: *Molecules* 23, 607-621 (2007)
- [46] Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Štork, F., Bačkor, M.: *Plant Soil* 320, 231-242 (2009)
- [47] Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M.: *J. Plant Physiol.* 166, 1460-1464 (2009)
- [48] Kolektiv: *Biochemie, skriptum PřF UK Praha*, str. 44 (2009)
- [49] Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gómez.Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernandez-Ocaña, Del Río, L.A., Barroso, J.B.: *Plant Cell Environ.* 29, 1449-1459 (2006)
- [50] Černý, M., Doubnerová, V., Müller, K., Ryšlavá, H.: *Biochimie* doi:10.1016/j.biochi.2010.06.019 (2010)
- [51] Potůčková, L.: *Studium NADP-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační*, Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 22-41 (2006)
- [52] Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)

